

MARÍA CLAUDIA IPUCHA

**Caracterização citogenética de Nereididae
(Annelida:Polychaeta), como auxilio nas relações
filogenéticas das espécies ocorrentes no Paraná**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética, Curso de Pós-Graduação em Genética – Área de concentração: Citogenética Animal, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo da Cunha Lana

CURITIBA

2006

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. O conhecimento corrente da citogenética dos poliquetas.....	1
1.2. O conhecimento corrente da citogenética dos poliquetas nereidídeos.....	4
1.3. Bandeamento cromossômico com impregnação de prata (NOR).....	8
2. Objetivos.....	10
3. Material e métodos.....	11
3.1. Material biológico e procedência.....	11
3.2. Condições de manutenção e manejo dos aquários.....	12
3.3. Obtenção de células mitóticas.....	12
3.4. Obtenção de metáfases.....	13
3.5. Obtenção de lâminas para estudos citológicos.....	13
3.6. Técnicas de coloração.....	14
3.6.1. Coloração convencional.....	14
3.6.2. Bandeamento NOR (HOWELL e BLACK, 1990).....	14
3.7. Análise do material citogenético.....	15
3.8. Fotografia.....	15
3.9. Cariogramas e idiogramas.....	15
4. Resultados.....	16
4.1. Resposta a cultivo em condições de laboratório.....	16
4.2. Otimização da técnica de obtenção de metáfases e bandeamento cromossômico.....	16
4.3. Análise citogenética.....	17
4.3.1. <i>Laeonereis culveri</i>	18
4.3.1.1. Caracterização do Cariótipo.....	18
4.3.1.2. Bandeamento NOR de <i>Laeonereis culveri</i>	19
4.3.2 <i>Nereis oligohalina</i>	19
4.3.2.1. Caracterização do Cariótipo.....	19
4.3.2.2. Bandeamento NOR em <i>Nereis oligohalina</i>	19
4.3.2.3. Idiograma de <i>Nereis oligohalina</i>	20
4.3.3. <i>Platynereis dumerilii</i>	22
4.3.3.1. Caracterização do cariótipo.....	22
4.3.3.2. Bandas NOR em <i>Platynereis dumerilii</i>	22
4.3.3.3. Idiograma de <i>Platynereis dumerilii</i>	23
4.3.4. <i>Perinereis ponteni</i>	25
4.3.4.1. Caracterização do cariótipo.....	25
4.3.4.2. Bandas NOR em <i>Perinereis ponteni</i>	25
4.3.4.3. Idiograma de <i>Perinereis ponteni</i>	26
4.3.5. <i>Perinereis anderssoni</i>	28

4.3.5.1. Caracterização do cariótipo.....	28
4.3.5.2. Bandas NOR em <i>Perinereis anderssoni</i>	28
4.3.5.3. Idiograma de <i>Perinereis anderssoni</i>	29
4.3.6. <i>Perinereis vancaurica</i>	31
4.3.6.1. Caracterização do cariótipo.....	31
4.3.6.2. Bandas NOR em <i>Perinereis vancaurica</i>	31
4.3.6.2. Idiograma de <i>Perinereis vancaurica</i>	32
4.3.7. <i>Pseudonereis palpata</i>	34
4.3.7.1. Caracterização do cariótipo.....	34
4.3.7.2. Bandas NOR em <i>Pseudonereis palpata</i>	34
4.3.7.3. Idiograma de <i>Pseudonereis palpata</i>	35
5. Discussão	37
5.1. <i>Platynereis dumerilii</i>	38
5.2. <i>Perinereis</i>	40
5.3. <i>Pseudonereis</i>	41
5.4. <i>Nereis</i> e <i>Neanthes</i>	41
5.5. <i>Laeonereis culveri</i>	42
5.6. Nereididae.....	43
6. Conclusões	45
GLOSSÁRIO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO 1.....	54
ANEXO 2.....	55
ANEXO 3.....	57

RESUMO

Este trabalho apresenta os primeiros estudos citogenéticos de poliquetas do Atlântico Sul, na Baía de Paranaguá (Paraná, Brasil). A família Nereididae foi escolhida por ser um dos grupos de poliquetas mais frequentes e amplamente distribuídos. Algumas espécies da família já tinham sido estudadas citogeneticamente por investigadores do hemisfério norte, que evidenciaram, em alguns casos, marcadas diferenças interpopulacionais. Tais descobertas sugerem a existência de divergências genéticas suficientes para separação de espécies morfológicamente muito próximas. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de tecido regenerativo depois da região caudal ser amputada. Os indivíduos foram tratados com 0.05% colchicina, a região caudal submetida a tratamento hipotônico e fixada em metanol: ácido acético glacial (3:1). Para a preparação das lâminas, o material fixado foi desagregado em 60% ácido acético. Posteriormente as células foram esmagadas em lâminas limpas e secas ao ar. As metáfases foram coradas com 10% Giemsa e também submetidas a bandeamento cromossômico por impregnação de prata para a detecção de NOR ativas. Cinco gêneros foram estudados: 1) *Platynereis*, representado por *Platynereis dumerilii* ($2n=28$; NF=56), espécie presumidamente cosmopolita, mas que constitui provavelmente um complexo de espécies. A comparação dos cariótipos e bandas NOR das populações do Paraná com os já descritos para populações do Atlântico Norte ($2n=28$; NF=56) revelou divergência cariotípica, mas as diferenças observadas em ambas localidades não apoiam a idéia de que pertençam a um complexo de espécies irmãs; 2) *Laeonereis*, representado por *Laeonereis culveri*, espécie ocorrente tanto no Atlântico Sul ($2n=38$) como no Norte, mostrou o maior número diplóide encontrado na família; 3) *Perinereis*, representado por *P. vancaurica* ($2n=28$, NF=56), *P. anderssoni* ($2n=28$, NF=56) e *P. ponteni* ($2n=28$, NF=54), sendo as duas últimas consideradas sinônimas por alguns autores e válidas por outros. As características cariotípicas e de bandas NOR permitiram associar *P. anderssoni* (Paraná, Brasil) com *P. macropus* (Itália), revelando que a primeira apresenta caracteres mais derivados. As restantes espécies do gênero são consideradas divergências independentes; 4) *Nereis*, representada por *N. oligohalina* ($2n=28$, NF=50) ocorrente no Atlântico Sul, e 5) *Pseudonereis*, representada por *P. palpata* ($2n=28$, NF=56), espécie que ocorre na costa Sul e Sudeste do Brasil. As duas últimas compartilham o número diplóide conservado da família. É discutida a evolução cariotípica como papel importante durante a origem das famílias modernas de poliquetas, promovendo a diversidade cromossômica atual ($2n=6$ até $2n=64$), seguida de um período de estabilidade cromossômica durante a dispersão posterior à ruptura da Pangea, a partir do qual passam a predominar divergências cariotípicas neutras, envolvendo, principalmente, alterações na posição do centrômero e amplificação de regiões NOR.

ABSTRACT

The present work describes for the first time cytogenetic characteristics of polychaetes from South Atlantic populations (Paranagua Bay, Paraná, Brazil). The Family Nereididae was chosen because it represents one of the most frequent and widespread groups. Some species had already been cytogenetically investigated by researchers from North hemisphere, showing in some cases pronounced inter-population differences, suggesting genetic divergences enough to separate species that are morphologically closely related. Mitotic chromosomes were obtained from regenerative tissue after amputation of the caudal region. Individuals were then treated with 0.05% colchicine; caudal tissue was then subjected to hypotonic treatment and fixed in methanol: glacial acetic acid (3:1). For slide preparation, a cell suspension was obtained by teasing the fixed material in 60% acetic acid. Cells were squashed onto clean slides and air-dried. Metaphase plates were conventionally stained with 10% buffered Giemsa, and slides were also submitted to a silver impregnation protocol for detection of active NORs. Five genera were analyzed: 1) *Platynereis* represented by *Platynereis dumerilii* ($2n=28$;NF=56), considered cosmopolitan but suspected as a species-complex. Karyotypic divergences were detected when comparing chromosome morphology and NOR distribution from Paraná and North American population ($2n=28$;NF=56), although those differences are not enough to support the species-complex idea; 2) *Laeonereis*, represented by *Laeonereis culveri*, occurring both in South and North Atlantic, showed the highest chromosome number in the family ($2n=38$); 3) *Perinereis*, represented by *P. vancaurica* ($2n=28$;NF=56), *P. anderssoni* ($2n=28$;NF=56) and *P. ponteni* ($2n=28$;NF=54). Karyotypes and NOR distribution allowed to relate *P. anderssoni* (Paraná, Brazil) with *P. macropus* (Italy), the former showing a derived karyotype. The remaining karyotypes from *Perinereis* species showed independent divergences; 4) *Nereis*, represented by *Nereis oligohalina* ($2n=28$;NF=50) occurring in South Atlantic; and 5) *Pseudonereis*, represented by *P. palpata* ($2n=28$;NF=56) species distributed on South and South-east coast from Brazil, the two later share the conservative chromosome number of the family. We discuss the important role of karyotypic evolution at the origin of modern families of polychaete, when the actual chromosomal diversity ($2n=6$ to $2n=64$) was promoted, followed by a period of chromosomal stability during dispersion that follows Pangea breakup, when came to predominate divergences of neutral chromosomal changes, involving mainly pericentric inversions and NOR amplifications.

1. Introdução

1.1 O conhecimento corrente da citogenética de poliquetas

A classe Polychaeta compreende cerca de 9000 espécies reconhecidas com vários milhares de nomes em sinonímia e uma sistemática bastante instável (ROUSE e PLEIJEL, 2001). Na costa brasileira foram descritas cerca de 800 espécies (AMARAL e JABLONSKI, 2005). A maioria das espécies são estritamente marinhas, mas ocorrem também em água doce, cavernas e até como parasitas de outros invertebrados. É um grupo bem adaptado de invertebrados marinhos, desempenhando nos fundos marinhos um papel semelhante aos das minhocas nos solos terrestres, contribuindo para a aeração dos fundos de areia e lodo e para a reciclagem de nutrientes (LANA e SANTOS, 2005) e constituindo, quase sempre, uma fração significativa da macrofauna bêntica.

Morfologicamente caracterizam-se pela presença de um par de parapódios laterais em cada segmento, portando numerosas cerdas (ou setas) de onde vem o nome de poliquetas. A maioria das espécies possui também uma faringe eversível. O corpo é pouco especializado, com exceção da cabeça que não apresenta segmentação. A região anterior do corpo está dividida em um prostômio, onde então localizados os olhos, palpos e antenas, e um peristômio a partir do qual emergem cirros tentaculares. Em geral os poliquetas possuem uma alta capacidade de regeneração corporal, principalmente da região posterior, mas muitas espécies também regeneram a região anterior. O tamanho pode variar de poucos milímetros até dois metros, mas a maioria das espécies mede menos de cinco centímetros. Algumas espécies têm sido utilizadas como bioindicadoras da qualidade ambiental por serem sensíveis à poluição, podendo assim indicar se há degradação do ambiente ao desaparecerem ou terem suas populações diminuídas. Por outro lado, algumas espécies são particularmente tolerantes ou resistentes à poluição por óleo ou por esgotos domésticos, tornando-se neste caso indicadoras de degradação ambiental, devido à sua presença em elevadas densidades quando a maioria das outras espécies acaba excluída (LANA e SANTOS, 2005).

Hábitos alimentares e características reprodutivas também apresentam uma ampla variação. Embora a maioria dos poliquetas seja comedora de detritos, existem muitas espécies carnívoras e algumas vivem como comensais ou parasitas de esponjas, moluscos e equinodermos. A maioria dos poliquetas é dióica e se reproduzem sexuadamente, embora algumas espécies sejam hermafroditas.

Dada a extensa variedade de formas e abundância, os poliquetas exercem um papel relevante no fluxo de energia e nutrientes do ecossistema marinho. Em vista de sua clara importância ecológica, existe uma crescente necessidade de informações a respeito dos cariótipos para estudos das relações evolutivas, taxonômicas e dos efeitos potenciais de mutagêneses ambientais e outros poluentes (JHA *et al.*, 1995).

CHRISTENSEN (1980) afirmou que só há informações sobre cariótipos de 3 % das espécies de poliquetas. Passados 25 anos desta constatação, os estudos citogenéticos em poliquetas continuam escassos, limitando-se em geral à determinação do número diplóide (JHA *et al.*, 1995), principalmente por causa da dificuldade de criação e obtenção de metáfases.

Os poliquetas estudados até hoje apresentam uma ampla variação cariotípica, com números diplóides que se estendem desde $2n=6$ (*Ophryotrocha labronica*, *O. costlowi*, *O. macrovifera*, *O. notoglandulata* e *O. pacifica* (VITTURI *et al.*, 2000)) até $2n=64$ (*Marphysa sanguinea* (HAYASHI KI *et al.*, 1996)), com o número modal próximo de 28. Até pouco tempo, acreditava-se que os números diplóides dos poliquetas tendiam a ser menores e menos variáveis do que em outros invertebrados marinhos (CHRISTENSEN, 1980). Porém, à medida que mais espécies vão sendo estudadas, maior é a amplitude de números diplóides encontrados. Não obstante, Oligochaeta continua sendo a classe de maior diversidade cariotípica, $2n=22-190$ (GREGORY e HEBERT, 2002).

Poucas famílias de poliquetas, como Capitellidae, Serpulidae, Dorvilleidae e Nereididae, foram suficientemente estudadas para permitir generalizações acerca da evolução de padrões cromossômicos (PESCH *et al.*, 1988a). Um desses estudos cariotípicos abrangentes foi realizado por ROBOTTI *et al.* (1991) em nove espécies do gênero *Ophryotrocha* (Dorvilleidae). Este grupo apresenta uma grande uniformidade com relação à morfologia, anatomia e fisiologia, mas um amplo espectro de estratégias reprodutivas. Apesar de apresentarem variação em números diplóides, de $2n=6$ até $2n=10$, não foi observada uma correlação direta entre alguns dos caracteres e os números diplóides. O conjunto de dados analisados pelos autores possibilitou a inferência de que a evolução reprodutiva (variável) e a morfológica (uniforme) não foram acompanhadas de evolução cariotípica e que, em geral, existe bastante uniformidade cariotípica entre grupos de espécies que compartilham um mesmo número diplóide. Tanto neste gênero como em *Capitomastus* (GRASSLE *et al.*, 1987), espécies com números diplóides conservados seguiram estratégias reprodutivas divergentes, sem que isto implicasse qualquer mudança cromossômica. Todavia, o caso do

gênero *Capitomastus* é ainda mais extremo, já que a variabilidade está representada em todos os níveis analisados: enzimas (com longas distâncias genéticas), reprodução, tipos de larvas, como também sem encontrar correlações entre estas mesmas variáveis. A pergunta a ser feita é: existe de fato uniformidade cariotípica?

As semelhanças reveladas por coloração convencional são pouco indicativas a respeito de homeologias genéticas (SEUÁNEZ, 1987). Isto é especialmente válido para taxa mais recentes, com compartimentalização de cromossomos reflectidos nas bandas G, e heterocromatina presentes em praticamente todo o complemento cromossômico. Essas duas características são as que facilitam (embora não promovam) mudanças cromossômicas heteróticas.

Nos poliquetas, a técnica de bandeamento G foi aplicada com êxito em *Ophryotrocha diadema* (DI e KNOWLES, 1992), poliqueta com $2n=8$. Embora tenha sido aplicada a uma única espécie do gênero, deve ser salientada a importância de ter sido detectada a presença de bandas G em uma espécie de anelídeo, demonstrando que as mudanças evolutivas na estruturação de segmentos cromossômicos, que levam à compartimentalização em composição de bases (refletindo a formação das bandas G), já havia começado a operar em invertebrados inferiores. Esta descoberta desmistifica a crença generalizada de que as bandas de replicação tardia evoluíram nos primeiros deuterostômios ou nos primeiros cordados (HOLMQUIST, 1989). DI e KNOWLES (1992) também assinalaram que a intensidade das bandas detectadas era relativamente fraca e interpretaram tal resultado como uma compartimentalização de bases de DNA pouco marcada.

A escassa heterocromatina, revelada por bandas C, em *Platynereis dumerilii* (JHA *et al.*, 1995) é uma característica compartilhada com o grupo de espécies do gênero *Ophryotrocha* (VITTURI *et al.*, 2000). Tendo em conta o ‘efeito de posição’ exercido pela heterocromatina sobre a regulação gênica, quando ocorrem rearranjos cromossômicos, certos genes podem modificar sua expressão pela proximidade de regiões heterocromáticas (PARDUE e HENNIG, 1990). Se a heterocromatina é de fato escassa em poliquetas, então, praticamente todo o DNA seria ativo e poderia estar se comportando como supergenes adaptados. Como consequência, são escassos também os sítios cromossômicos inertes que poderiam facilitar alterações na ordem gênica. Portanto, qualquer mutação estrutural exerceria efeitos mais drásticos ou deletérios e, sendo assim, é de se esperar que a evolução cariotípica neste grupo de animais tenha sido de fato lenta (VITTURI *et al.*, 2000).

Se cariótipos conservados são de fato a norma nas diferentes linhagens de poliquetas, ao mesmo tempo que polimorfismos de seqüências redundantes são encontrados (SELLA *et al.*, 1995; VITTURI *et al.*, 2000; JHA *et al.*, 1995), o grupo encontrar-se-ia no segundo ou terceiro estágio do modelo de canalização cariotípica (BICKHAM e BAKER, 1979). Indicando que, depois de terem estabelecido o cariótipo “ótimo” para a linhagem qualquer rearranjo cromossômico com produção de heteroses negativa seria eliminado. Não é o caso das mudanças heterocromáticas que, como é sabido, não apresentam heteroses negativa. Se o caso for comprovado, certamente estaríamos na presença de mais um exemplo apoiando o modelo de canalização de BICKHAM e BAKER (1979).

Em resumo, a abordagem citogenética de poliquetas é limitada quando comparada com outros taxa. A escassez de heterocromatina e bandas G não oferece caracteres citogenéticos do tipo a serem utilizados em comparações filogenéticas. Deste modo, cariótipos e bandas NOR passam a ser, neste grupo, os caracteres que poderão refletir o curso da evolução cariotípica.

1.2 O conhecimento corrente da citogenética dos poliquetas nereidídeos

A família Nereididae está organizada em 40 gêneros e cerca de 450 espécies. Desse total, 46 espécies foram registradas na costa brasileira (SANTOS e LANA, 2001), sendo 14 na Baía de Paranaguá (LANA, 1984). Dentre os poliquetas, este é o grupo mais conhecido e amplamente distribuído. O tamanho dos indivíduos pode variar de poucos milímetros, em *Micronereis*, até um pouco mais de 1 m, em *Neanthes virens*. Quando vivos, podem ser transparentes, marrons ou exibirem uma grande variedade de padrões de pigmentação em diferentes cores (GLASBY, 1999; WILSON, 2000). A família é considerada monofilética (GLASBY, 1993; ROUSE e FAUCHALD, 1997).

Os caracteres morfológicos distintivos da família são a presença de uma faringe eversível composta de dois anéis, notopódios e neuropódios com cerdas compostas (Fig. 1), sendo uma sinapomorfia do grupo as cerdas compostas do notopódio. Há um par de mandíbulas na parte anterior da faringe e dois pares de olhos e quatro pares de cirros peristomiais na região da cabeça.



Figura 1.: a, Faringe evertida com dois anéis (quando retraída, as mandíbulas se localizam dentro da cabeça). **b**, cerda composta. Copyright © 2004 Greg Rouse.

As características reprodutivas apresentam uma ampla variação. A maior parte das espécies é gonocórica, embora algumas sejam hermafroditas; a fecundação pode ser interna ou externa. O tipo de reprodução mais conhecido é a epigamia, que envolve modificações morfológicas em machos e fêmeas (o indivíduo modificado recebe o nome de epítoco), seguidas de uma fase pelágica e fecundação externa na coluna d'água. Os epítocos podem ser pouco ou marcadamente dimórficos. *Platynereis dumerilii* é uma das espécies mais bem conhecidas, possuindo a forma epítoca bem descrita. No epítoco, os olhos são hipertrofiados, os cirros dorsais e ventrais dos segmentos anteriores apresentam a base inflada, com numerosas células sensoriais, importantes para a orientação dos parceiros durante a desova; a região posterior caracteriza-se por uma mudança de coloração e por modificações parapodiais. Os lóbulos e língulas parapodiais sofrem hipertrofia, tornando-se lamelares ou foliáceos; as setas apresentam forma de remos e são especializadas para a natação. O processo é completado quando os epítocos nadam até a superfície e liberam seus gametas através da ruptura do corpo. Logo após, o indivíduo morre. Em seguida, os ovos desenvolvem-se em larvas que posteriormente sofrem assentamento. A duração do processo pode variar entre 1-2 semanas no caso de *Platynereis dumerilii*, dois meses em *Nereis grubei* e três meses em *Perinereis cultrifera* (CLARK, 1961; SCHROEDER e HERMANS, 1975).

Sabe-se que mudanças na temperatura e/ou ciclo da lua, são estímulos ambientais para os indivíduos entrarem em fase reprodutiva (LAST e OLIVE, 1999; HUTCHINSON *et al.*, 1995; MAZURKIEWICZ, 1975; KLESCH 1970).

Assim como os poliquetas em geral, os nereidídeos mostram uma capacidade regenerativa bem desenvolvida, mas isto é particularmente evidente em condições naturais. Uma espécie da família, *Nereis virens*, foi estudada a este respeito por LAST e OLIVE (1999) em condições de laboratório. Eles analisaram diferentes fatores ambientais que poderiam influenciar na regeneração e encontraram que o fotoperíodo era o fator mais crítico. Demonstraram no seu trabalho que um fotoperíodo programado com 16h luz: 8h escuridão (comparado com o ciclo inverso, 8:16), resultava em uma taxa de regeneração superior e, além disso, também era maior a quantidade de segmentos adicionados antes de deterem totalmente o crescimento. Em ambos os casos as diferenças eram estatisticamente significativas.

Oito espécies da família Nereididae foram analisadas citogeneticamente, mostrando 10 cariomorfos diferentes. Representam 4 gêneros e a maioria das espécies apresentou um

número diplóide de $2n=28$ (OMETZ, 1963; PESCH *et al.*, 1988; WEINBERG, 1990; ZHENG *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1992; LIPARI *et al.*, 1994; JHA *et al.*, 1995).

A Fig. 2 apresenta parte do cladograma dos gêneros da família Nereididae, destacando os clados que contêm os gêneros de interesse nesta pesquisa (em sublinhado). O cladograma foi construído a partir dos dados de caracteres morfológicos.

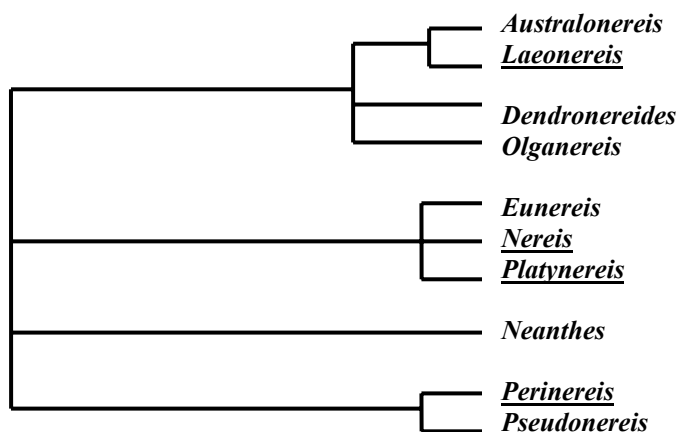


Figura 2: Cladograma parcial dos gêneros da família Nereididae. Rouse & Pleijel (2001).

Até hoje só foram descritos cariótipos de populações ocorrentes no hemisfério Norte. Os escassos estudos citogenéticos realizados até o presente momento, acentuam a importância de se realizar uma abordagem genética (ou não-morfológica) como subsídio à taxonomia do grupo.

O gênero *Laeonereis* está formado por duas espécies, das quais *L. culveri* espécie era considerada restrita ao Atlântico Norte, enquanto *L. acuta*, estaria restrita Atlântico Sul (PETTIBONE, 1971; ORENSANZ & GIANUCA, 1974). Encontra-se em andamento uma revisão do gênero (Oliveira, segundo SANTOS, informação verbal), que evidencia que as espécies são sinônimas e valida o nome mais antigo *L. culveri*. Até o momento não há na literatura qualquer registro citogenético sobre o gênero.

O gênero *Nereis* compreende 134 espécies. Destas, *N. oligohalina* ocorre no oceano Atlântico e é encontrada na região entre marés de manguezais e praias areno-lodosas. A espécie ainda não foi estudada citogeneticamente, mas existem outras três espécies do gênero já cariotipadas: *Nereis diversicolor*, $2n=28-32$ (OMETZ, 1963), *N. acuminata*, $2n=18-22$, propondo a existência de um complexo de espécies irmãs (WEINBERG, 1990) e *Neanthes (Nereis) arenaceodentata*, $2n=18-24$, sugerindo a validação de espécies distintas (PESCH *et al.*, 1988).

O gênero *Platynereis* está formado por 20 espécies, das quais *Platynereis dumerilii* é considerada cosmopolita, embora vários autores acreditem que sob este nome se abriga um complexo de espécies com pouca diferenciação morfológica (HAGGER *et al.*, 2002; HUTCHINSON *et al.*, 1998, 1995; JHA *et al.*, 1997, 1996, 1995). Isto reforça a necessidade de se realizar abordagens genéticas como suporte taxonômico. Além de ser o nereidídeo mais bem estudado citogeneticamente, amostras populacionais de *P. dumerilii* estão sendo mantidas em condições de laboratório há longa data e utilizadas como rotina em ensaios de mutagênese ambiental (HAGGER *et al.*, 2002; HUTCHINSON *et al.*, 1998, 1995; JHA *et al.*, 1997, 1996). Esta espécie apresenta um cariótipo de $2n=28$, $NF=56$, e os achados em bandas C e NOR (JHA *et al.*, 1995) revelaram escassa heterocromatina e dois pares cromossômicos portadores de regiões organizadoras do nucléolo.

O gênero *Neanthes* está formado por 50 espécies, das quais apenas *N. japonica* foi citogeneticamente analisada. Esta apresenta um número diplóide de $2n=28$, $NF=56$, e a particularidade de ser a primeira espécie da família na qual foi achado um sistema de determinação do sexo do tipo XX-XY (SATO e IKEDA, 1992). Depois de *Polydora curiosa* (Spionidae) (KORABLEV, 1999), é a segunda espécie de poliquetas a ser descrita com cromossomos sexuais. Em ambos os casos, o cromossomo Y foi bem maior do que o X e ambas as espécies, embora filogeneticamente distantes, ocorrem no Mar do Japão.

O gênero *Perinereis*, considerado polifilético, está composto de 60 espécies. *P. ponteni*, *P. anderssoni* e *P. vancaurica* ocorrem no oceano Atlântico e são encontradas na região entre marés. As duas primeiras espécies ocorrem em simpatria e haviam sido consideradas sinônimas por HARTMAN (1959), embora tratadas como válidas por outros autores (LANA, 1984; SANTOS, 1996; STEINER, 2001). Foram determinados os cariótipos de três espécies do gênero: *P. nuntia* com $2n=28$ (ZHENG *et al.*, 1992), *P. macropus* com $2n=28$ (LIPARI *et al.*, 1994) e *P. cultrifera* com $2n=34$ (OMETZ, 1963).

O gênero *Pseudonereis* compreende sete espécies. *P. palpata* está distribuída na região Sul e Sudeste do Brasil e é encontrada na região entre marés, em costões rochosos entre tufos de algas e em colônias do poliqueta sabelariídeo *Phragmatopoma*.

Os dados citogenéticos preliminares indicam que alguns membros da família Nereididae podem ter sofrido diferenciação cromossômica não acompanhada de modificação externa significativa, o que acentua a necessidade de se utilizar a citogenética como base para refinamento dos estudos taxonômicos (PESCH, G.G.; PESCH, C.E.; MULLER, 1988).

1.3 Bandeamento cromossômico com impregnação de prata (NOR)

Os cromossomos podem ser bandeados longitudinalmente ou não, aplicando-se diversas metodologias, entre as quais e amplamente utilizadas na citogenética clássica, destacam-se as bandas C (revelando posição e quantidade de heterocromatina), as G (mostrando o padrão de compartimentalização do DNA no genoma) e as NOR (ou RON, que evidenciam as regiões organizadoras dos nucléolos).

As regiões organizadoras do nucléolo (NOR, do inglês *Nucleolar organizer regions*) foram caracterizadas pela primeira vez por McCLINTOCK (1934), que igualmente atribuiu o nome de NOR (ou RON) àquelas regiões cromossômicas responsáveis pela organização nucleolar durante a intérfase mitótica. Cada organizador nucleolar corresponde a uma série repetitiva de genes de RNAr (LEWIN, 2000). As NOR são uma exceção dentre os DNAs transcritos por gerarem uma estrutura visível, o nucléolo, dentro do núcleo interfásico (CLARK e WALL, 1996). O nucléolo é o sítio de formação dos ribossomos, ou seja, onde eles são transcritos e processados. Os nucléolos são formados durante a telófase e a transcrição cessa ao longo da mitose (MILLER, 1981; CLARK e WALL, 1996). Somente as NOR ativas participam da formação do nucléolo. Normalmente existem várias NOR por genoma e a quantidade pode variar de uma espécie para outra, assim como o tamanho e a atividade em cada ciclo celular (SCHWARZACHER e WACHTLER, 1986). Os nucléolos apresentam uma tendência à fusão, de modo que seu número por célula é usualmente inferior ao número de NOR (MILLER, 1981).

Quando as NOR estão presentes em múltiplas cópias, usualmente são de localização telomérica, o que minimiza os efeitos de intercâmbio entre cromossomos não homólogos (MILLER, 1981), fenômeno que pode ser facilitado pela tendência à fusão nucleolar.

Esta técnica por impregnação de prata envolve a extração do ADN, ARN e histonas, sugerindo que as proteínas residuais restantes da transcrição dos ribossomos seriam os componentes corados pela prata. No entanto, a verdadeira natureza das proteínas responsáveis pela impregnação ainda não é conhecida.

Pelo fato da técnica detectar unicamente NOR que estiveram ativas, é bastante comum encontrar variação na quantidade de marcações inter- e intraindividualmente (INSUA e THIRIOT-QUIÉVREUX, 1991; REN e XIANJUE, 1993; DERJUSHEVA *et al.*, 1998; VOLLETH, 1987, JHA *et al.*, 1995; VITTURI *et al.*, 2000; LIPARI e VITTURI, 1994).

Os trabalhos realizados em um grupo de espécies do gênero *Ophryotrocha* (SELLA *et al.*, 1995) são exemplos de como a aplicação de técnicas de bandeamento cromossômico,

neste caso NOR, proporciona informações que permitem inferir relações filogenéticas entre grupos de espécies relacionadas. Estes trabalhos chegaram a propor que o cariótipo de *O. diadema* ($2n=8$) teria se originado por fusão cêntrica a partir do cariótipo de *O. robusta* ($2n=10$), dando seqüência à idéia, proposta inicialmente por ROBOTTI *et al.* (1991), de que o $2n=10$ estaria representando o cariótipo primitivo dentro do gênero e a forma $2n=6$ seria uma condição derivada com redução de segregação independente (redução de variabilidade genética). De um grupo de 10 espécies analisadas no gênero *Ophryotrocha*, novamente *O. robusta* foi considerada ancestral pela presença de um só par de regiões NOR conservada, enquanto o restante das espécies apresentou um alto grau de polimorfismos para este marcador (VITTURI *et al.*, 2000).

2 Objetivos

Há uma crescente necessidade de informações a respeito dos cariótipos para estudos das relações evolutivas, citotaxonomia e dos efeitos potenciais de mutagêneses ambientais e outros poluentes (JHA *et al.*, 1995). A rica diversidade de morfologia, adaptações ecológicas, estratégias reprodutivas e estilos de vida, entre outros, tem as suas bases na variação genética. Apesar da importância ecológica, os conhecimentos genéticos sobre os poliquetas estão restritos a relativamente poucas espécies (JHA *et al.*, 1995). Em vista da clara importância ecológica destes organismos, este trabalho objetivou caracterizar citogeneticamente espécies de poliquetas nereidídeos ocorrentes na região litorânea do Paraná, na tentativa de fornecer subsídios à taxonomia bem como propiciar uma melhor compreensão das relações filogenéticas da família Nereididae.

Os objetivos específicos foram:

- a) Desenvolver e padronizar condições de laboratório que permitam manter em cultura as diferentes espécies a serem analisadas;
- b) Determinar os cariótipos das diferentes espécies através da coloração convencional;
- c) Caracterizar o padrão de distribuição das Regiões Organizadoras do Nucléolo (RON) dos cromossomos.

3 Material e métodos

3.1 Material biológico e procedência

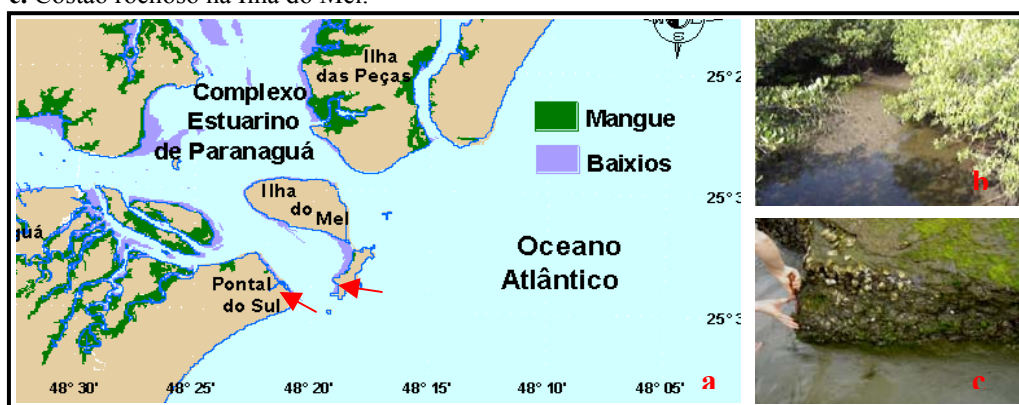
As espécies analisadas, sua procedência e ocorrência são indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies analisadas.

Espécie	Procedência – ambiente	N	Ocorrência
<i>Platynereis dumerilii</i>	Ilha do Mel – Costão rochoso	11	Cosmopolita
<i>Perinereis ponteni</i>	Ilha do Mel – Costão rochoso	46	Oceano Atlântico, desde México até Brasil
<i>Perinereis anderssoni</i>	Ilha do Mel – Costão rochoso	70	Costa Atlântica das Américas
<i>Perinereis vancaurica</i>	Canal Perequê – Manguezal	4	Oceano Atlântico Sul
<i>Nereis oligohalina</i>	Canal Perequê – Manguezal	18	Oceano Atlântico Ocidental
<i>Pseudonereis palpata</i>	Ilha do Mel – Costão rochoso	4	Sul e Sudeste do Brasil
<i>Laeonereis culveri</i>	Canal Perequê – Manguezal	20	Oceano Atlântico ocidental

Os indivíduos foram coletados em dois habitats diferentes na região costeira de Pontal do Sul e Ilha do Mel. No costão rochoso da Ilha do Mel foram coletadas *Perinereis ponteni*, *P. anderssoni*, *Pseudonereis palpata* e *Platynereis dumerilii* (S25°33'48,6" W48°19'05,2" e S25°34'23,7" W48°18'35,4"). No manguezal do canal Perequê em Pontal do Sul foram coletadas *Perinereis vancaurica*, *Laeonereis acuta* e *Nereis oligohalina* (S24° 34'25,7" W48° 34'23,7") (Fig. 3).

Figura 3: a. Localidades de coletas do material biológico indicadas com setas; b. manguezal do canal Perequê; c. Costão rochoso na Ilha do Mel.



As coletas foram realizadas de forma manual, preferencialmente nos períodos de maré baixa. Os exemplares associados a algas e moluscos, nas rochas, foram isolados e separados com auxílio de espátulas (Fig 3c). As espécies que ocorrem no manguezal foram coletadas em amostras areno-lodosas, com auxílio de uma pá. Após isolados, os animais foram

acondicionados em recipientes plásticos com água do local, dentro de caixas de isopor, e transportados até o laboratório em condições refrigeradas.

3.2 Condições de manutenção e manejo dos aquários

Uma vez no laboratório, os indivíduos foram mantidos em aquários arejados, com água do mar proveniente da praia de Pontal do Sul, com pelo menos uma troca semanal. A alimentação, a cada três dias, consistiu em uma mistura de espinafre triturado e alimento comercial para organismos marinhos (*Artemia salina* em pasta).

Até abril de 2005, os aquários ficaram acomodados em uma prateleira distante da janela, numa sala com uma ampla variação de temperatura. Naquelas condições, não foi possível controlar o fotoperíodo incidente nos aquários nem a temperatura da água, que variou de 15 a 26°C, o que resultou em dificuldades na obtenção de material citogenético, relacionadas a dois fatores principais: 1) uma alta taxa de mortalidade como consequência da entrada em fase reprodutiva dos indivíduos, quando cessa a atividade mitótica, 2) uma baixa taxa de regeneração, relacionada com as variações de temperatura e o fotoperíodo.

A partir de maio do 2005, os aquários foram mantidos dentro de uma câmara especialmente construída, na qual se mantiveram as condições de uma temperatura estável em 18°C e um fotoperíodo de 16h luz: 8h escuridão.

3.3 Obtenção de células mitóticas

A obtenção de tecido proliferativo é pré-requisito quando se pretende trabalhar com metáfases. Em poliquetas, desprovidos de medula óssea, rim, ou linfócitos, estruturas amplamente utilizadas na citogenética de organismos mais derivados, há duas alternativas para a obtenção de metáfases. Uma delas é obter células mitóticas de tecido embrionário ou larvas e a outra, utilizada neste trabalho, é a partir de tecido em regeneração.

Como já foi mencionado, os poliquetas sob certas condições apresentam uma alta taxa de regeneração, além de uma região posterior em contínuo crescimento. A fim de aumentar a quantidade de tecido em divisão os indivíduos tiveram sua região caudal amputada em aproximadamente 1cm. A partir daí, esperou-se até duas semanas (em média), tempo suficiente para o extremo posterior regenerar e evitar a diferenciação completa desta região (Fig.4).

Figura 4: Extremo regenerando (parte mais clara).



3.4 Obtenção de metáfases

A técnica utilizada para a obtenção de metáfases foi baseada nas rotinas descritas por JHA *et al.* (1995), para *Platynereis dumerilii*, com modificações adaptadas à utilização de tecido regenerativo.

- a. O indivíduo regenerado foi tratado com uma solução de Colchicina 0,05% em água de mar durante 1h e 10 min, a 18°C.
- b. O extremo regenerado foi amputado com bisturi e submetido a uma serie de tratamentos hipotônicos de 10 min cada (água de mar: 0,06M KCl, nas proporções 2:1;1:1;1:2 e 1:3).
- c. O restante do corpo foi conservado em formaldeído a 8% e, após dois dias, transferido para etanol 70%, para posterior confirmação específica e, quando possível, determinação do sexo.
- d. Após o tratamento hipotônico o tecido foi pré-fixado em metanol-ácido acético (3:1), na geladeira, por aproximadamente 20 min.
- e. A solução foi retirada com pipeta e substituída por 1 ml de fixador. Este passo foi repetido três vezes, em intervalos de 15 min cada um, e sempre trabalhando em geladeira.
- f. O tecido fixado foi mantido em freezer até ser utilizado na preparação das lâminas.

3.5 Obtenção de lâminas para estudos citológicos.

As lâminas foram previamente preparadas, sendo lavadas em detergente neutro, a 10%, enxaguadas em água corrente, secadas e colocadas em solução sulfocrômica (bicromato de potássio- ácido sulfúrico). No dia seguinte foram retiradas, enxaguadas e novamente secas. A seguir foram submersas em etanol PA e conservadas a 4°C até serem utilizadas. Antes de ser gotejado o material citológico, as lâminas foram novamente enxaguadas em água e submersas em água destilada a 60°C. Na seqüência os seguintes passos foram observados:

- a. O tecido, imerso em cerca de quatro a seis gotas de ácido acético glacial 60%, foi colocado em uma lâmina côncava e, inicialmente, desagregado com ajuda de agulhas e, posteriormente, com pipeta de Pasteur até virar uma suspensão translúcida. O ácido acético foi utilizado para facilitar a desagregação celular.
- b. A suspensão foi gotejada em várias lâminas molhadas e pré-aquecidas em banho Maria a 60°C.
- c. Alternativamente, gotas de suspensão foram colocadas em uma lâmina e o material esmagado com uma segunda lâmina.
- d. Em ambos os casos as lâminas foram secas ao ar.

3.6 Técnicas de coloração

3.6.1 Coloração convencional

As lâminas foram submersas em uma solução de Giemsa (Merck) a 10% em tampão Sörensen, pH 6,8-7,0 (0,067M KHPO_4 , monofosfato de potássio) durante 10 minutos. Logo após foram lavadas em água destilada e secas ao ar ambiente.

3.6.2 Bandeamento NOR (HOWELL e BLACK, 1980)

As lâminas, previamente analisadas em coloração convencional, foram lavadas em duas trocas de xilol durante no máximo 5 min cada lavagem, até extrair todo resto de óleo de imersão. Logo após, foram submersas em duas trocas de fixador metanol - ácido acético glacial 3:1 até o Giemsa ser eliminado. Posteriormente foram secas ao ar ambiente e os seguintes passos foram obedecidos:

- a. Os preparados foram incubados em uma solução de tampão borato (0,1M Na_2SO_4 + $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), pH=0,0-9,2 a temperatura ambiente durante 7 min, lavados em água deionizada e secados ao ar.
- b. Após, foi colocado sobre o material uma parte de solução coloidal, a 5%, para duas partes de nitrato de prata, a 50%, adicionando-se uma gota de formalina, a 1%, para cada ml de prata. As soluções foram homogeneizadas com pipeta e cobertas com lamínula.
- c. Em seguida foram acondicionados em uma câmara úmida a 70°C, durante 4 a 9 min, até a solução apresentar uma coloração caramelo-dourada com formação de pequenas bolhas de ar.

- d. Imediatamente foram lavados em água destilada, a seguir em tiosulfato de sódio 5%, e secados ao ar.

3.7 Análise do material citogenético.

O material citológico foi analisado ao microscópio ótico e, em média, 10 metáfases por espécie foram avaliadas quanto à morfologia e número cromossômico. Para esta análise, as metáfases com cromossomos distinguíveis individualmente foram desenhadas em papel.

3.8 Fotografia

As melhores metáfases foram fotomicrografadas em um microscópio Zeiss equipado com uma câmara fotográfica automática de 35 mm. Na maioria das fotos foi utilizado um optovar de 1.25 até 2.0.

As fotomicrografias foram obtidas em filme preto e branco, Panatomic-X ISO 32, 35mm, revelado em D-76 (1:1). Após, foi fixado (fixador Kodak), durante 20-30min, lavado em água corrente e seco ao ar. Nas ampliações foi utilizado papel fotográfico Kodak F3.

Alternativamente, algumas imagens de metáfases em coloração convencional foram digitalizadas utilizando o sistema de captura Case Data Manager Expo 2.0, posteriormente impressas em papel fotográfico.

3.9 Cariogramas e idiogramas

A partir das fotomicrografias foram montados os cariogramas dos indivíduos para, posteriormente, serem digitalizados e mensurados no programa CorelPHOTO-PAINT 9. Os dados das medições de cada um dos cromossomos foram inseridos em uma planilha do EXCEL, previamente formatada para cálculo do índice centromérico, comprimento relativo e erro padrão.

A morfologia cromossômica foi determinada segundo LEVAN *et al.* (1964). Finalmente foram desenhados no WORD os idiogramas de cada uma das espécies com a combinação de dados do índice centromérico e comprimento relativo. No Anexo 1 são indicadas as fórmulas utilizadas para ambos os cálculos.

4 Resultados

4. 1 Resposta a cultivo em condições de laboratório

De todas as espécies mantidas em laboratório, somente *Laeonereis culveri* se mostrou extremamente sensível, sobrevivendo, no máximo, apenas três semanas. Antes de se conseguir controlar temperatura e fotoperíodo, a principal causa de morte nesta espécie, ao menos no que foi possível se observar, parecia ser a entrada em fase reprodutiva. É sabido que a espécie é induzida a se reproduzir com aumentos de temperatura, mas surpreendentemente, após manutenção sob temperatura controlada e estável de 18-18,5°C, a taxa de mortalidade aumentou significativamente. A profundidade do substrato e a riqueza em detritos do mesmo são algumas das possibilidades a serem consideradas em futuros experimentos. Infelizmente, não foi possível realizar testes e controles mais aprimorados para facilitar o cultivo da espécie.

As outras espécies, em particular aquelas dos gêneros *Perinereis* e *Platynereis*, foram muito tolerantes à cultura em laboratório sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, sendo que as mortes detectadas foram reduzidas e, na maioria dos casos, resultantes do estresse inicial provocado pelo transporte. Também foi observada uma alta tendência ao canibalismo em *Perinereis anderssoni* em relação a indivíduos da própria espécie como também com os das outras espécies, particularmente quando a densidade populacional no aquário era elevada. Contudo, nas condições controladas, foi possível manter indivíduos vivos por mais de quatro meses até o processamento. Todos aceitaram bem o alimento administrado.

Platynereis dumerilii, que também mostrou facilidade de cultivo, formava o seu tubo poucos minutos após colocação no aquário, seja na superfície do vidro ou nas conchas presentes no fundo.

4. 2 Otimização das técnicas de obtenção de metáfases e bandeamento cromossômico

A obtenção de metáfases em geral, e em particular daquelas com uma qualidade adequada para as análises com todos os cromossomos do complemento, devidamente espalhados, com as cromátides nítidas e posição do centrômero evidente, foi a etapa mais difícil de se reproduzir. A experiência acumulada sugere que para os próximos ensaios seja realizada uma pré-seleção por faixa etária, priorizando etapas larvais e juvenis, já que indivíduos mais jovens regeneram uma quantidade de segmentos significativamente maior do

que os adultos, no mesmo período de tempo e sob as mesmas condições ambientais. Maior quantidade de segmentos regenerados reflete não somente uma maior taxa de divisão mitótica, mas também indica que o ciclo de divisão mitótica está inversamente correlacionado à idade.

A aplicação da técnica de bandas C, conforme o preconizado por SUMNER (1972), para a detecção da heterocromatina constitutiva foi realizada repetidas vezes sem se obter êxito. Acreditamos que a falta de marcação não esteja refletindo ausência de heterocromatina nas espécies analisadas, mas uma falha na extração diferencial de cromatina, devido ao grau, em geral elevado, de contração cromossômica dos preparados.

Por outro lado, na técnica de bandejamento NOR, cujo mecanismo de ação é independente do grau de contração da cromatina, marcações foram obtidas com relativa facilidade. No entanto, foi inesperada a instabilidade das marcações nos preparados, que simplesmente desapareciam em poucas horas, dificultando a obtenção de microfotografias de boa qualidade, na maioria dos casos.

4. 3 Análise citogenética

Na tabela 2 são apresentados o total de indivíduos e metáfases analisadas para determinar os cariótipos, índice centromérico e localização dos organizadores nucleolares. O número de indivíduos analisados refere-se à quantidade de indivíduos que foram processados citogeneticamente e dos quais se obtiveram metáfases. As metáfases analisadas referem-se ao total de metáfases observadas ao microscópio. Foram utilizadas no cálculo do índice centromérico somente aquelas metáfases com uma morfologia nítida que permitisse identificar a localização do centrômero em todos os cromossomos do complemento. Em bandas NOR são indicadas unicamente aquelas metáfases que apresentaram pelo menos uma marcação.

Tabela 2. Resumo da análise citogenética nas espécies estudadas. N= quantidade de indivíduos processados; Met. = metáfases; N/d= não determinado.

Espécie	N	Indivíduos analisados	Metáfases analisadas	Met. utilizadas no I.C.	Met. Com bandas NOR
<i>Laeonereis culveri</i>	20	6	17	N/d	N/d
<i>Nereis oligohalina</i>	18	10	21	1	1
<i>Platynereis dumerilii</i>	11	7	46	7	3
<i>Perinereis ponteni</i>	46	28	87	10	7
<i>Perinereis anderssoni</i>	70	28	209	10	17
<i>Perinereis vancaurica</i>	4	1	30	2	1
<i>Pseudonereis palpata</i>	4	2	23	6	7

Com exceção de *Laeonereis culveri*, que apresentou um número diplóide de $2n=38$ cromossomos, todas as demais espécies de nereidídeos analisadas apresentaram um $2n=28$, com números fundamentais (=NF) que variam de 50 a 56. As diferenças mais marcadas entre os cariótipos das distintas espécies começaram a se evidenciar a partir da construção dos respectivos idiogramas. Nenhuma das espécies de nereidídeos evidenciou a presença de cromossomos sexuais. As fórmulas utilizadas para os cálculos de índice centromérico e comprimento relativo estão detalhadas no anexo 1.

4.3.1 *Laeonereis culveri*

4.3.1.1 Caracterização do cariótipo.

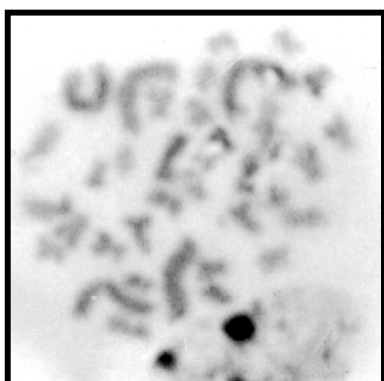
Laeonereis culveri apresentou um número diplóide de $2n=38$. Não foi possível determinar com precisão o NF devido à qualidade dos cromossomos da única metáfase completa que foi achada

Foram analisadas 17 metáfases de seis indivíduos (Tabela 3). Embora o número modal corresponda aos menores valores observados, a confirmação do $2n=38$ foi realizada a partir da observação de duas células não rompidas, no interior das quais se pode observar, a presença de 38 elementos, como mostrado na metáfase da Figura 5. Devido à impossibilidade de definir a localização do centrômero em todos os elementos do cariótipo, não foi possível elaborar o idiograma de *Laeonereis culveri*.

Tabela 3: Análise do complemento cromossômico de *Laeonereis culveri*.

Células analisadas N=17	Número cromossômico			
	31 ou menos	33	36	38
Quantidade de células	6	5	4	2
Porcentagem	35,3	29,41	23,52	11,76
Número cromossômico modal ($2n$)=29-31				

Figura 5. Metáfase em coloração com convencional de *Laeonereis culveri*.



4.3.1.2 Bandeamento NOR

Nenhuma das metáfases tratadas com impregnação de prata exibiu marcações satisfatórias.

4.3.2 *Nereis oligohalina*

4.3.2.1 Caracterização do cariótipo

Nereis oligohalina apresentou um número diplóide de $2n=28$ e $NF=50$ (Fig 6). O complemento cromossômico está composto de sete pares metacêntricos, um par submetacêntrico, três pares subtelocêntricos e três pares telocêntricos.

O complemento cromossômico foi caracterizado a partir da observação de 21 metáfases obtidas de três indivíduos (Tabela 4), nos quais o número modal de cromossomos igual a 28 ocorreu em 57% das células analisadas. Metáfases com menos cromossomos do que o número modal foram consideradas produto de rupturas celulares, ocorridas durante a preparação das lâminas citológicas.

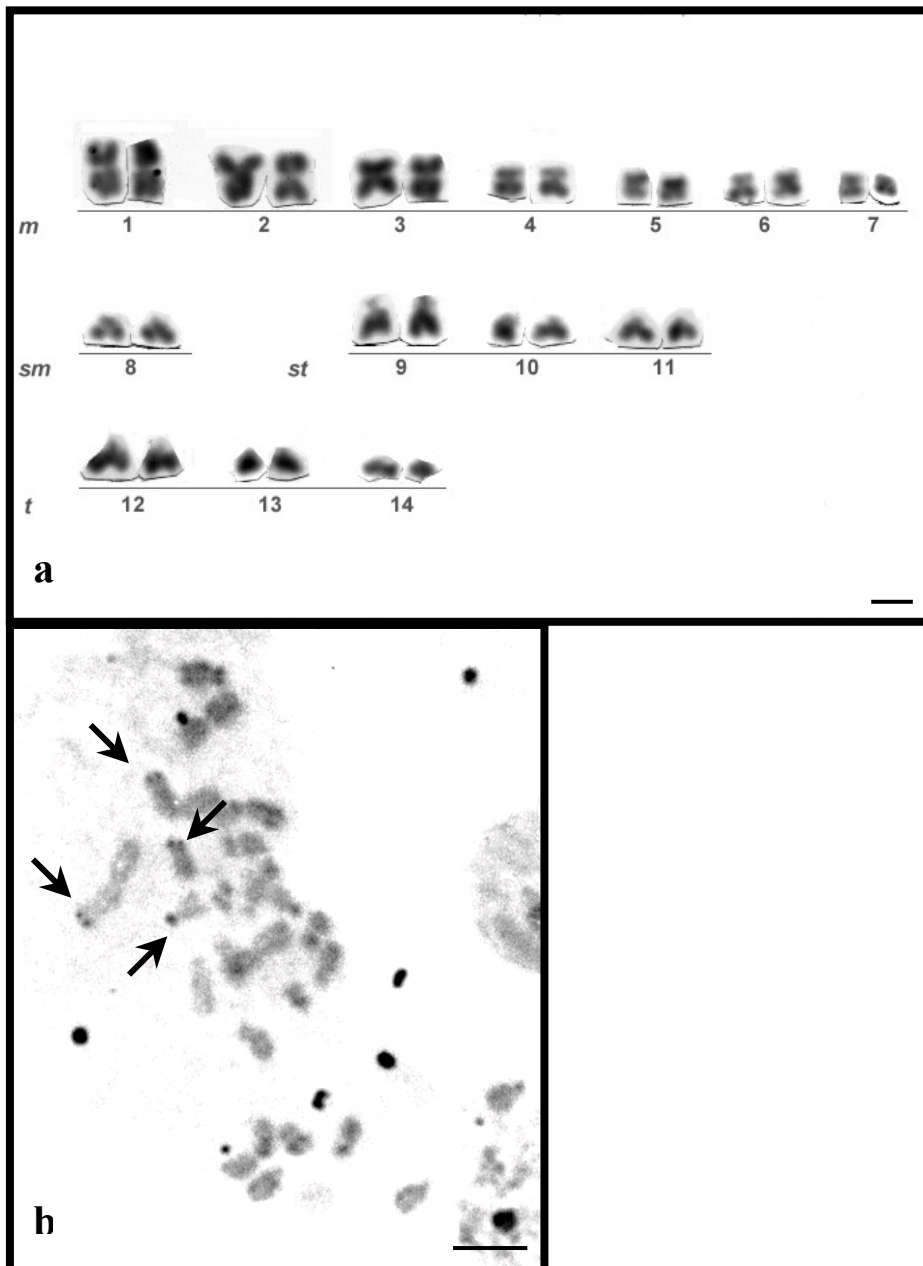
Tabela 4: Análise do complemento cromossômico de *Nereis oligohalina*.

Células analisadas	Número cromossômico			
	25 ou menos	26	27	28
N=21				
Quantidade de células	6	3	...	12
Porcentagem	28,57	14,28	0	57
Número cromossômico modal ($2n$)=28; NF =50				

4.3.2.2 Bandeamento NOR em *Nereis oligohalina*

Duas metáfases originárias de dois indivíduos, coradas com nitrato de prata, mostraram quatro marcações. As localizações dos organizadores nucleolares foram evidenciadas nas regiões teloméricas dos braços longo do par 1 e curto do par 12 (Fig. 6b e 7).

Figura 6: Cariograma de *Nereis oligohalina* em coloração convencional, organizado segundo o tamanho e morfologia cromossômica (a); Bandeamento NOR (b). As setas indicam os cromossomos portadores da região organizadora do nucléolo. As barras representam 10µm.



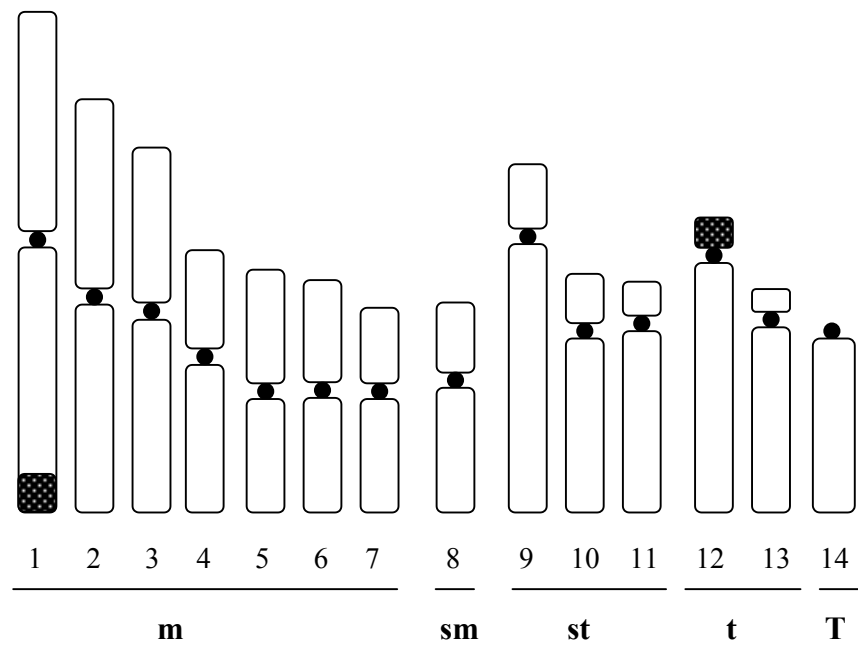
4.3.2.3 Idiograma de *Nereis oligohalina*

O idiograma de *N. oligohalina* (Fig. 7) foi construído a partir das medições de uma única metáfase. Por esse motivo na Tabela 5 não são indicados os valores do erro padrão.

Tabela 5: Medidas cromossômicas e classificação baseadas em uma única metáfase. “m”=metacêntrico; “sm”=submetacêntrico; “st”=subtelocêntrico; “t”=telocêntrico; “T”=telocêntrico estrito.

Par cromossômico	Comprimento relativo (%) (média \pm 2SE)	Índice centromérico (média \pm 2SE)	Morfologia cromossômica
1	12,86	43,36	m
2	10,61	47,79	m
3	9,28	44,3	m
4	6,63	40,1	m
5	6,1	47,8	m
6	5,83	49,95	m
7	5,16	41,99	m
8	5,17	35,85	Sm
9	8,89	19,34	St
10	5,96	22,18	St
11	5,57	16,18	St
12	7,54	11,63	t
13	5,56	11,8	t
14	4,66	0	T

Figura 7: Idiograma dos cromossomos de *Nereis oligohalina* construído a partir dos valores do comprimento relativo e índice centromérico apresentados na Tabela 5. As regiões escuras representam os organizadores nucleolares.



4. 3. 3 *Platynereis dumerilii*

4. 3. 3 . 1 Caracterização do Cariótipo

Platynereis dumerilii apresenta um complemento cromossômico de $2n=28$, $NF=56$, com todos os cromossomos bibrâquiados (igual a dois braços distintos) distribuídos em 10 pares metacêntricos e quatro pares submetacêntricos (Fig. 8). Em dois dos indivíduos analisados, observou-se um heteromorfismo no quarto par cromossômico (três metáfases no total). Considerando que um mesmo indivíduo mostrou presença e ausência do heteromorfismo, não existiria suspeita se tratar de cromossomos sexuais. Esta diferença poderia ser explicada por uma contração cromossômica diferencial nesta fase mitótica.

A tabela 6 sintetiza os resultados dos números cromossômicos analisados em um total de 46 células a partir de sete indivíduos adultos. As metáfases com números inferiores ao valor modal de $2n=28$ (56%) foram consideradas incompletas devido a rupturas celulares ocorridas durante o preparado das lâminas citológicas.

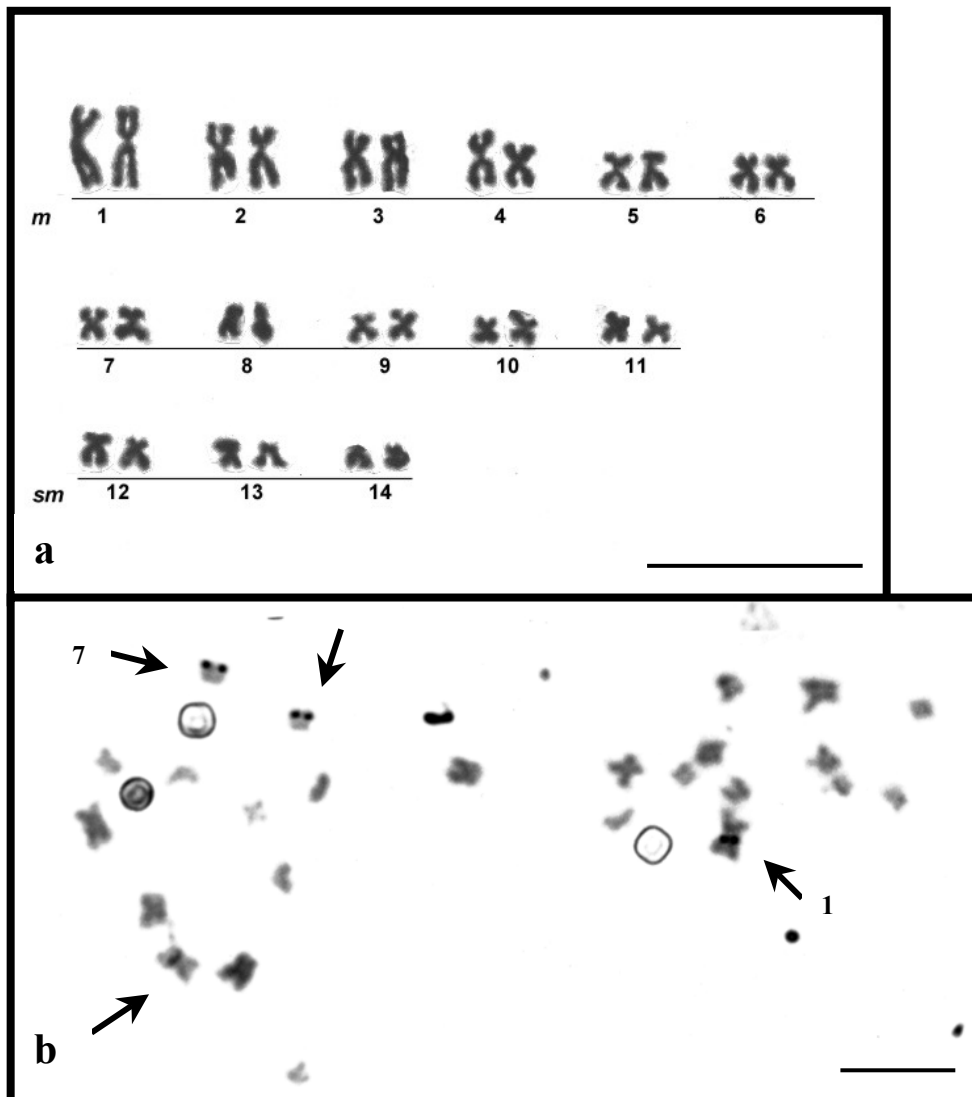
Tabela 6.: Análise do complemento cromossômico de *Platynereis dumerilii*

Células analisadas N=46	Número cromossômico			
	25 ou menos	26	27	28
Quantidade de células	15	3	2	26
Porcentagem (%)	32,6	6,5	4,4	56
Número cromossômico modal ($2n$)=28				

4.3.3.2 Bandeamento NOR de *Platynereis dumerilii*

Três metáfases de dois indivíduos foram coradas com nitrato de prata. Em um dos animais foram observadas duas marcações localizadas na região telomérica do par cromossômico 7, enquanto que no outro, com quatro marcações, além do par 7, foi detectada também uma marcação intersticial proximal no braço longo do par 1 (Fig. 8b e 9).

Figura 8: Cariograma de *Platynereis dumerilii* em coloração convencional com Giemsa (a); metáfase com bandeamento NOR (b). As setas indicam os cromossomos portadores das regiões organizadoras do nucléolo nos pares 1 e 7. As barras representam 10µm.



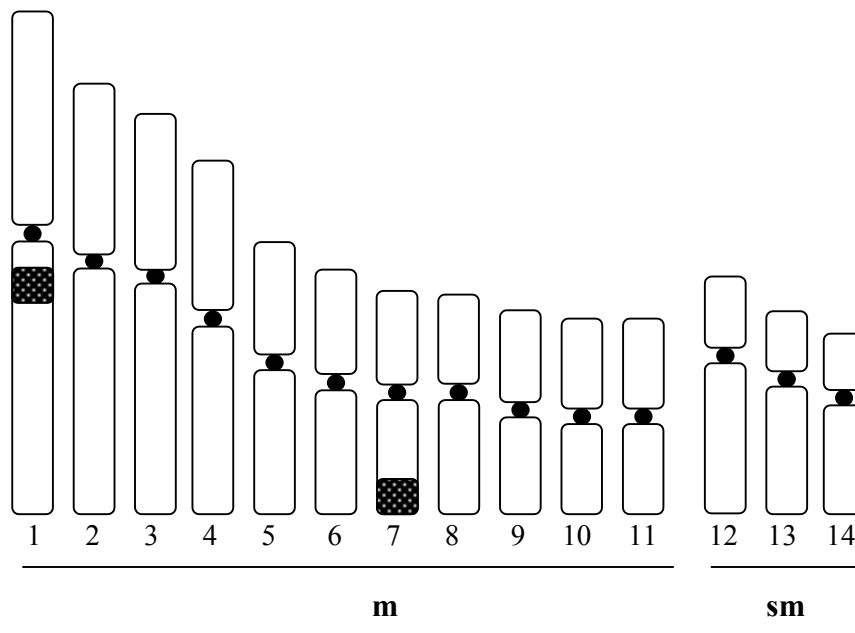
4. 3. 3 . 3 Idiograma de *Platynereis dumerilii*

O idiograma de *Platynereis dumerilii* (Fig 9) foi construído a partir das medições de sete metáfases obtidas dos três indivíduos analisados (Tabela 7).

Tabela 7: Medidas cromossômicas e classificação baseada em sete metáfases de *Platynereis dumerilii*. "m"=metacêntrico; "sm"=submetacêntrico, SE = Erro padrão.

Par cromossômico	Comprimento relativo (%) (média \pm 2SE)	Índice centromérico (média \pm 2SE)	Morfologia cromossômica
1	13,29 \pm 0,17	43,9 \pm 05	m
2	11,36 \pm 0,12	40,99 \pm 0,62	m
3	10,56 \pm 0	40,37 \pm 0,08	m
4	9,2 \pm 0,04	44,3 \pm 1,29	m
5	7,03 \pm 0,09	44,07 \pm 1,17	m
6	6,23 \pm 0,15	45,72 \pm 1,07	m
7	5,68 \pm 0	45,21 \pm 0,11	m
8	5,56 \pm 0,06	43,89 \pm 0,54	m
9	5,16 \pm 0,12	48,7 \pm 1,98	m
10	5,01 \pm 0,05	49,66 \pm 0,01	m
11	5,01 \pm 0,05	49,82 \pm 0,06	m
12	6,13 \pm 0,22	31,88 \pm 0,26	sm
13	5,11 \pm 0,28	31,87 \pm 1,2	sm
14	4,6 \pm 0,02	33,59 \pm 1,19	sm

Figura 9. Idiograma da morfologia dos cromossomos de *Platynereis dumerilii* construído a partir dos valores do comprimento relativo e índice centromérico (Tabela 7). As regiões escuras representam as regiões organizadoras do nucléolo.



4.3.4 *Perinereis ponteni*

4.3.4.1 Caracterização do Cariótipo

O cariótipo de *Perinereis ponteni* apresenta um número diplóide de $2n=28$ e $NF=54$, formado de 13 pares metacêntricos e um par telocêntrico pequeno (Fig. 10).

O número diplóide ($2n = 28$, 66,66%), foi caracterizado a partir da observação de 87 metáfases obtidas de 25 indivíduos (Tabela 8). Metáfases com mais ou menos cromossomos do que o número modal foram consideradas produtos de rupturas e misturas celulares, respectivamente, ocorridas durante a preparação das lâminas citológicas.

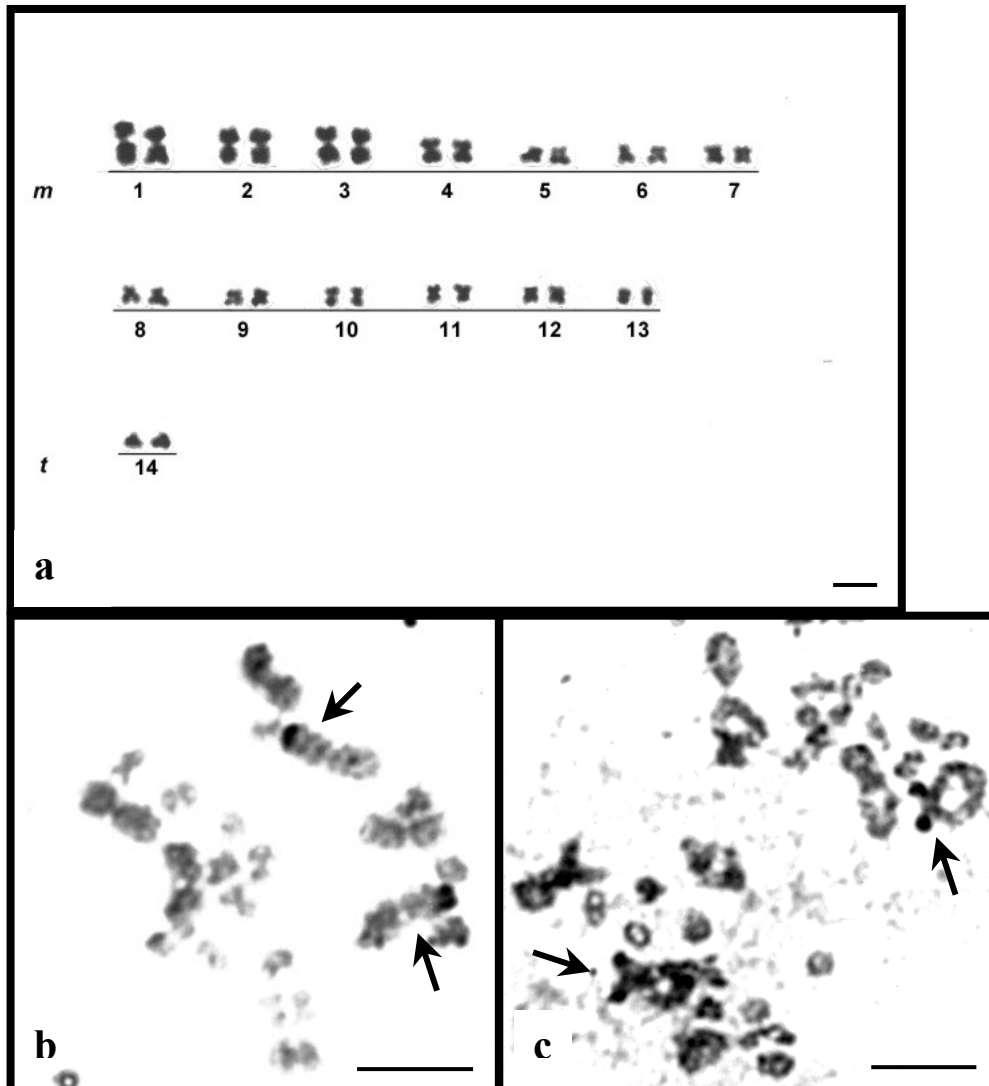
Tabela 8: Análise do complemento cromossômico de *Perinereis ponteni*.

Células analisadas N=87	Número cromossômico				
	25 ou menos	26	27	28	29 ou +
Quantidade de células	17	11	9	58	4
Porcentagem	19,54	12,64	10,34	66,66	4,59
Número cromossômico modal ($2n=28$; $NF = 54$)					

4.3.4.2 Bandeamento NOR em *Perinereis ponteni*

Além de sete metáfases mitóticas de três exemplares, coradas com nitrato de prata, também foram analisadas três metáfases meióticas (MI), onde se evidenciou um único par cromossômico (par 1) com marcação na região telomérica do braço longo (Fig. 10b,c e 11).

Figura 10: Cariograma de *Perinereis ponteni* em coloração convencional, organizado em dois grupos conforme a morfologia cromossômica (a); bandeamento NOR em uma metáfase mitótica (b); bandeamento NOR em duas metáfase meióticas (MI) (c). As setas mostram os cromossomos portadores da região do organizador nucleolar. As barras representam 10µm.



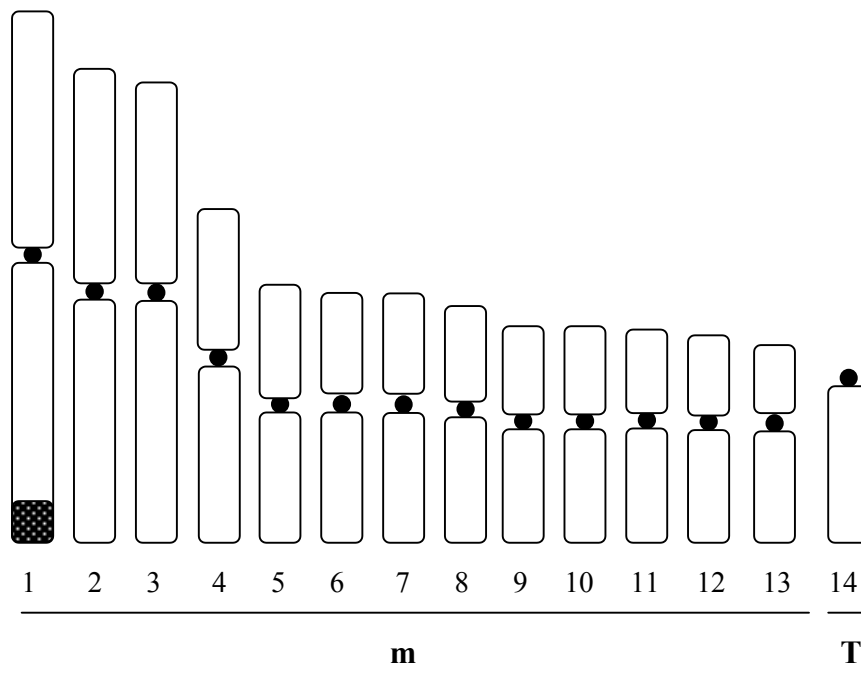
4.3.4.3 Idiograma de *Perinereis ponteni*

O idiograma de *Perinereis ponteni* (Fig. 11) foi construído a partir das medições de nove metáfases obtidas dos três indivíduos analisados (Tabela 9)

Tabela 9: Medidas cromossômicas e classificação baseada em nove metáfases de *Perinereis ponteni*. "m"=metacêntrico; "t"=telocêntrico; SE= Erro padrão.

Par cromossômico	Comprimento relativo (%) (média \pm 2SE)	Índice centromérico (média \pm 2SE)	Morfologia cromossômica
1	13,57 \pm 0,05	45,67 \pm 0,39	m
2	12,04 \pm 0,14	46,82 \pm 0,42	m
3	11,67 \pm 0,08	45,67 \pm 0,54	m
4	8,32 \pm 0,06	44,48 \pm 0,23	m
5	6,53 \pm 0,07	45,65 \pm 0,56	m
6	6,05 \pm 0,12	43,51 \pm 0,83	m
7	6,01 \pm 0,03	43,59 \pm 0,86	m
8	5,77 \pm 0,06	43,19 \pm 0,62	m
9	5,68 \pm 0,06	45,32 \pm 1,2	m
10	5,28 \pm 0,06	43,62 \pm 0,46	m
11	5,14 \pm 0,1	42,19 \pm 1,33	m
12	5,03 \pm 0,05	41,64 \pm 1	m
13	4,73 \pm 0,06	38,19 \pm 1,5	m
14	4,1 \pm 0,24	0 \pm 0	t

Figura 11: Idiograma dos cromossomos de *Perinereis ponteni* construído a partir dos valores do comprimento relativo e índice centromérico apresentados na Tabela 9. A região escura representa a região organizadora do nucléolo.



4.3.5 *Perinereis anderssoni*

4.3.5.1 Caracterização do cariótipo

Perinereis anderssoni apresenta um complemento cromossômico de $2n=28$, $NF=56$. Os 14 pares cromossômicos bibrâquiados foram agrupados em 10 pares metacêntricos e quatro pares submetacêntricos (Fig. 12), conforme o índice centromérico.

Para a caracterização do número diplóide foram analisadas 209 metáfases de um total de 70 indivíduos (Tabela 10). Metáfases que apresentaram números diplóides menores que o modal ($2n=28$, 71%) foram consideradas incompletas como resultado de rupturas celulares durante a preparação citológica.

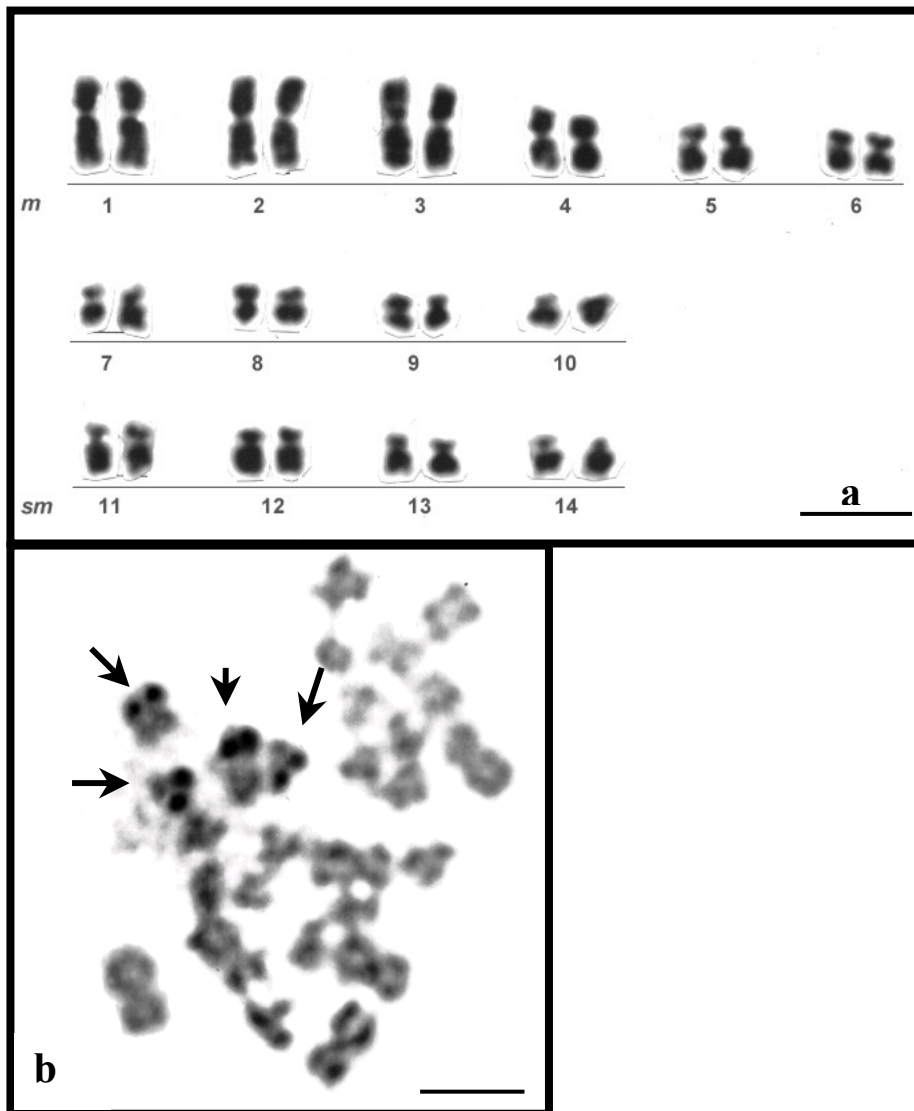
Tabela 10: Análise do complemento cromossômico de *Perinereis anderssoni*.

Células analisadas N=209	Número cromossômico			
	25 ou menos	26	27	28
Quantidade de células	31	13	15	150
Porcentagem	14,83	6,22	7,17	71,0
Número cromossômico modal ($2n$)=28; NF =56				

4.3.5.2 Bandeamento NOR em *Perinereis anderssoni*

Nas dezessete metáfases de quatro indivíduos, coradas com nitrato de prata, foram evidenciadas de duas a dez marcações, sendo esta variação inter- e intraindividual. Na figura 12b se observa uma com quatro marcações. No idiograma (Fig. 13), foram representadas aquelas com o número máximo de marcações observadas (= 10), com a seguinte distribuição: regiões teloméricas do braço longo do cromossomo 7, do braço curto do cromossomo 8, do braço curto e intersticial proximal do braço longo do cromossomo 11, e telomérica do braço curto do cromossomo 12. Infelizmente as marcações desta metáfase foram perdidas, pois se esvaeceram antes de serem fotomicrografadas. A reconstrução da localização das bandas foi realizada tendo por base as metáfases em coloração convencional junto ao desenho esquemático, em papel, das mesmas, porém bandeadas. Esse padrão de bandas foi observado em cinco metáfases de um mesmo indivíduo, que apresentou de duas a dez marcações.

Figura 12: Cariograma de *Perinereis anderssoni*, em coloração convencional e organizado segundo a morfologia cromossômica (a); bandeamento NOR de uma metáfase com quatro marcações (b). As setas indicam cromossomos portadores do organizador nucleolar. As barras representam 10µm.



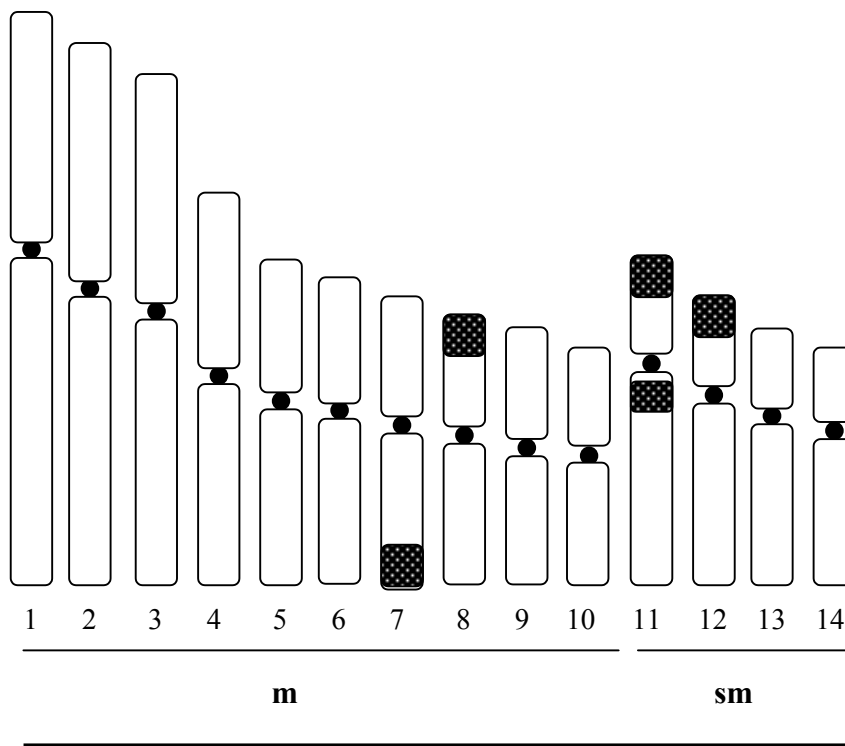
4.3.5.3 Idiograma de *Perinereis anderssoni*

O idiograma de *Perinereis anderssoni* (Fig. 13) foi construído a partir das medições de seis metáfases obtidas de quatro indivíduos (Tabela 11).

Tabela 11: Medidas cromossômicas e classificação baseada em seis metáfases de *Perinereis anderssoni*. "m"=metacêntrico; "sm"=submetacêntrico; SE=Erro padrão..

Par cromossômico	Comprimento relativo (%) (média \pm 2SE)	Índice centromérico (média \pm 2SE)	Morfologia cromossômica
1	12,16 \pm 0,15	41,34 \pm 0,2	m
2	11,47 \pm 0,16	45,23 \pm 0,7	m
3	10,77 \pm 0,11	46,34 \pm 0,43	m
4	8,18 \pm 0,09	46,59 \pm 0,3	m
5	6,72 \pm 0,05	43,03 \pm 0,9	m
6	6,33 \pm 0,07	43,27 \pm 0,79	m
7	6 \pm 0,05	43,46 \pm 0,72	m
8	5,6 \pm 0,07	43,9 \pm 0,9	m
9	5,25 \pm 0,09	46,69 \pm 0,73	m
10	4,79 \pm 0,13	44,46 \pm 0,76	m
11	6,68 \pm 0,09	30,63 \pm 0,54	sm
12	5,93 \pm 0,07	33,32 \pm 0,35	sm
13	5,24 \pm 0,07	33,23 \pm 0,48	sm
14	4,8 \pm 0,05	33,84 \pm 0,48	sm

Figura 13: Idiograma dos cromossomos de *Perinereis anderssoni* baseados nos valores do comprimento relativo e índice centromérico apresentados na Tabela 11. As regiões escuras representam os organizadores nucleolares.



4.3.6 *Perinereis vancaurica*

4.3.6.1 Caracterização do cariótipo.

O complemento cromossômico de *Perinereis vancaurica* mostra um número diplóide de $2n=28$ e $NF=56$, com todos os elementos bibrâquiados (Fig. 14). Conforme o índice centromérico foram evidenciados 13 pares cromossômicos metacêntricos e um par submetacêntrico.

O complemento cromossômico foi caracterizado a partir da observação de 30 metáfases de um único indivíduo, (Tabela 12). Metáfases com mais ou menos cromossomos do que o número modal ($2n=28$, 70%) foram consideradas produto de rupturas e misturas celulares, respectivamente, ocorridas durante a preparação das lâminas citológicas.

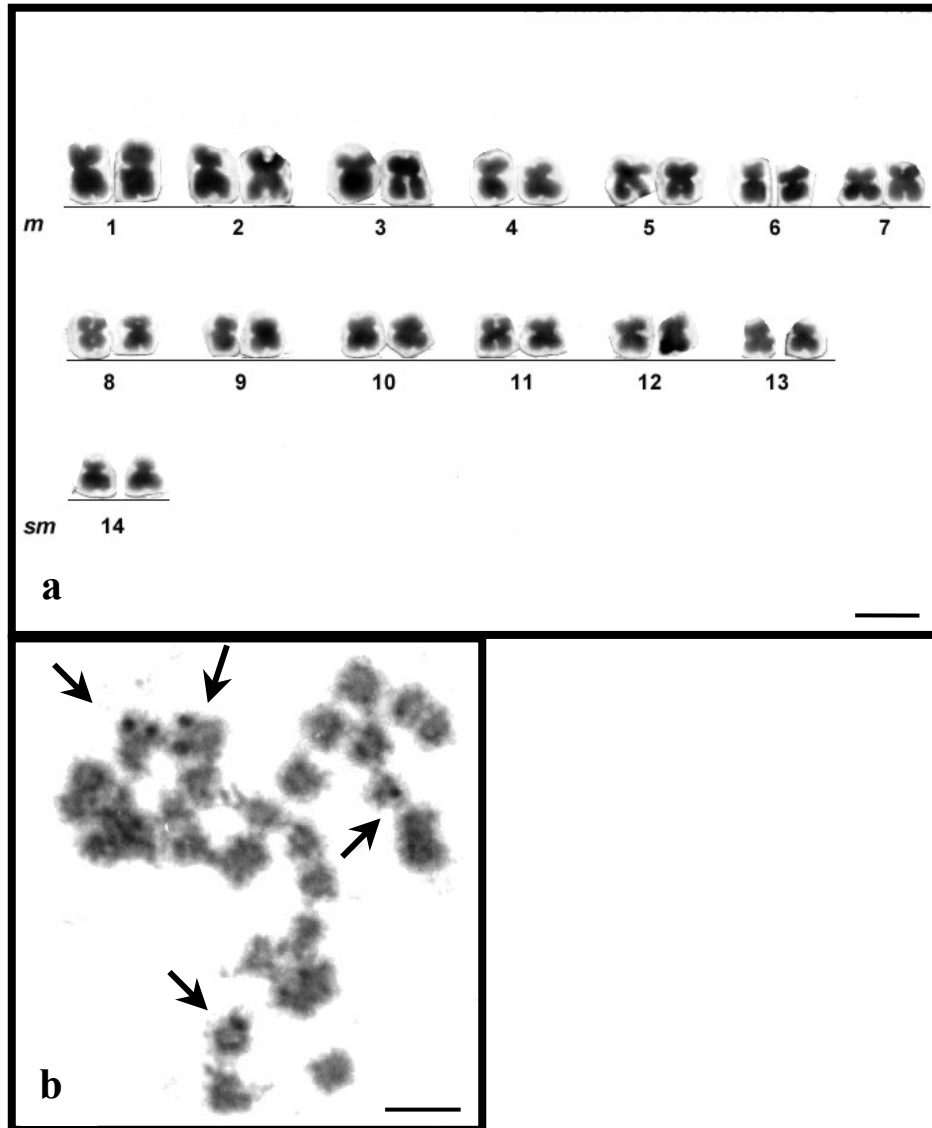
Tabela 12: Análise do complemento cromossômico de *Perinereis vancaurica*.

Células analisadas N=30	Número cromossômico				
	25 ou menos	26	27	28	30
Quantidade de células	7	1	..	21	1
Porcentagem	23,4	3,3	0	70	3,3
Número cromossômico modal ($2n$)=28; NF =56					

4.3.6.2 Bandeamento NOR em *Perinereis vancaurica*

Uma única metáfase (a mesma apresentada no cariógrama) foi analisada com nitrato de prata. O indivíduo apresentou dois pares cromossômicos portadores da região organizadora nucleolar, em um deles localizada na região telomérica do braço longo do segundo par cromossômico, e a outra localizada na região telomérica do braço curto do nono par cromossômico (Fig. 14b e 15)

Figura 14: Cariograma de *Perinereis vancaurica* em coloração com Giemsa (a); bandeamento NOR (b). As setas indicam os cromossomos portadores da região organizadora do nucléolo. As barras representam 10µm.



4.3.6.3 Idiograma de *Perinereis vancaurica*.

O idiograma de *Perinereis vancaurica* (Fig. 15) foi construído a partir das medições de duas metáfases obtidas de um único indivíduo (Tabela 13).

4.3.7 *Pseudonereis palpata*

4.3.7.1 Caracterização do cariótipo.

Pseudonereis palpata apresenta um número diplóide de $2n=28$, $NF=56$, com todos os cromossomos bibrâquiados (Fig. 16). O cariótipo está organizado em 11 pares cromossômicos metacêntricos e três pares submetacêntricos.

O complemento cromossômico foi caracterizado a partir da observação de 23 metáfases de dois indivíduos (Tabela 14), sendo que 86,95% das metáfases analisadas mostraram $2n=28$. Metáfases com menos cromossomos do que o número modal de 28, são consideradas produto de rupturas celulares, ocorridas durante a preparação das lâminas citológicas.

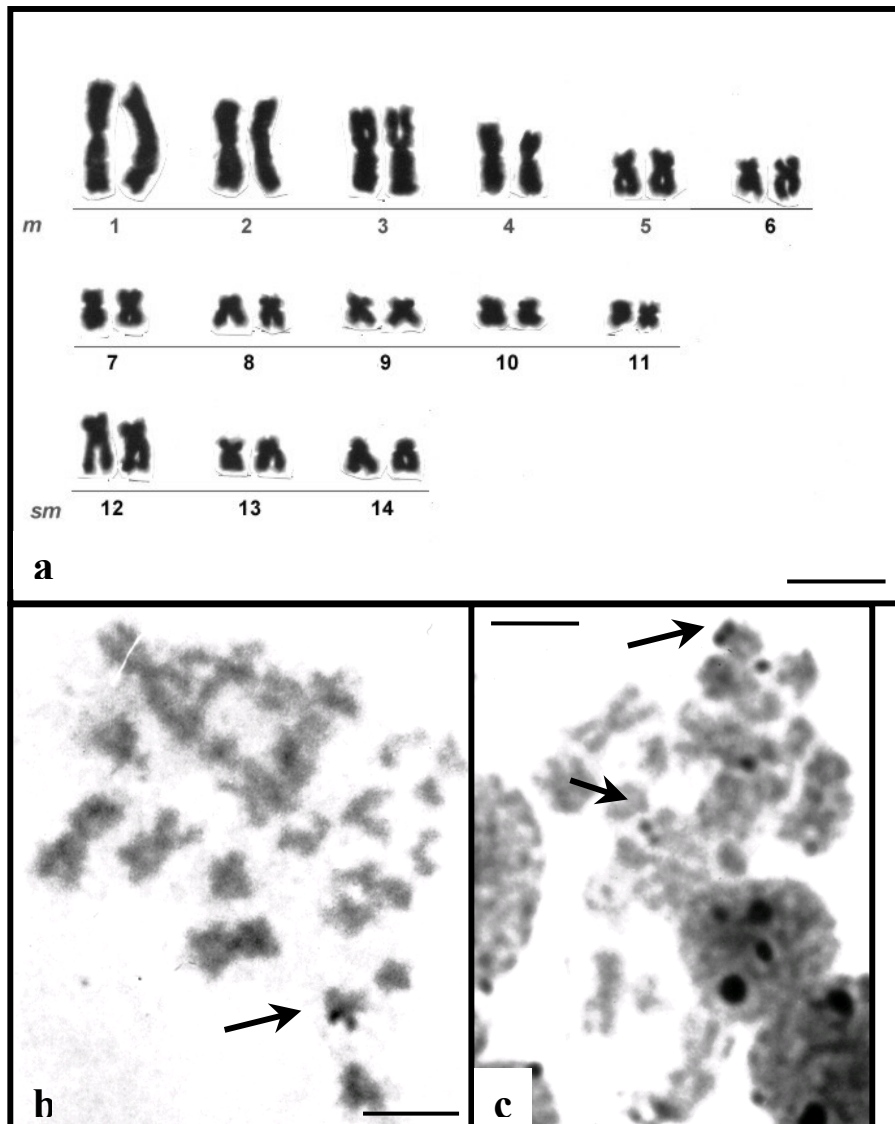
Tabela 14: Análise do complemento cromossômico de *Pseudonereis palpata*.

Células analisadas N=23	Número cromossômico			
	25 ou menos	26	27	28
Quantidade de células	1	...	2	20
Porcentagem	4,34	0	8,69	86,95
Número cromossômico modal ($2n=28$; $NF=56$)				

4.3.7.2 Bandeamento NOR em *Pseudonereis palpata*.

Sete metáfases de dois indivíduos foram bandeadas com prata. Um dos indivíduos apresentou uma única metáfase com duas marcações cromossômicas e o outro mostrou uma metáfase com duas e cinco com uma. Em ambas as situações, as marcações foram localizadas no telômero do braço curto do par 13 (Fig.16b,c e 17).

Figura 16: Cariograma de *Pseudonereis palpata* com coloração convencional, organizado segundo o tamanho e morfologia cromossômica (a); bandeamento NOR com uma marcação (b) e com duas marcações (c). As setas indicam os cromossomos portadores das regiões organizadoras do nucléolo. As barras representam 10µm.



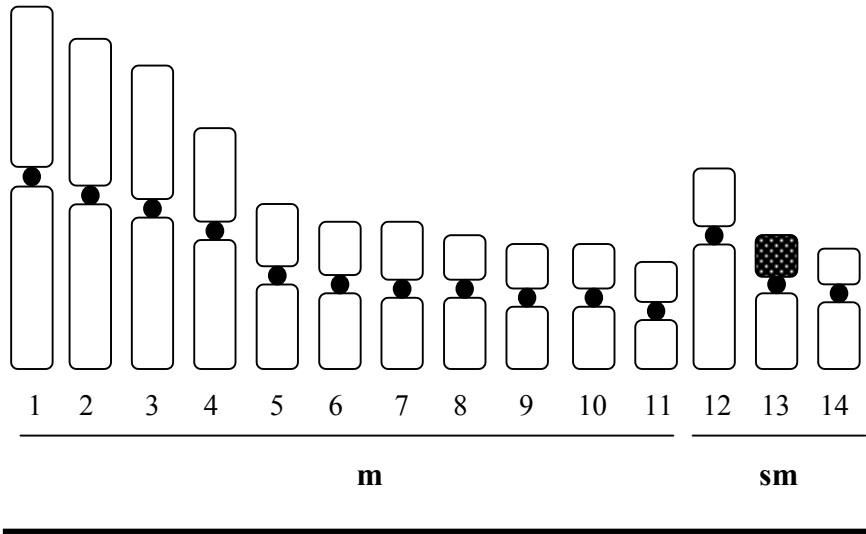
4.3.7.3 Idiograma de *Pseudonereis palpata*

O idiograma de *P. palpata* (Fig. 17) foi construído a partir das medições de 4 metáfases obtidas dos dois indivíduos analisados (Tabela 15).

Tabela 15: Medidas e classificação cromossômicas baseadas em quatro metáfases. “m”=metacêntrico; “sm”=submetacêntrico; SE= Erro padrão.

Par cromossômico	Comprimento relativo (%) (média ± 2SE)	Índice centromérico (média ± 2SE)	Morfologia cromossômica
1	14,32 ± 0,26	46,48 ±0,33	m
2	12,95 ± 0,06	47,21 ± 0,27	m
3	11,93 ± 0,13	46,97 ±0,5	m
4	9,2 ± 0,13	41,59 ± 1,17	m
5	6,22 ± 0,11	42,75 ± 0,49	m
6	5,42 ± 0,03	40,73 ± 0,93	m
7	5,33 ± 0,09	45,06 ± 0,1	m
8	4,92 ±0,09	39,93 ± 0,3	m
9	4,62 ± 0,13	42,14 ± 0,3	m
10	4,47 ± 0,09	42,26 ± 1,02	m
11	3,8 ± 0,1	43,56 ± 0,67	m
12	7,63 ± 0,03	32,67 ± 0,8	sm
13	4,8 ± 0,03	34,61 ± 0,6	sm
14	4,3 ± 0,17	33,65 ± 0,6	sm

Figura 17: Idiograma de *Pseudonereis palpata*, construído a partir dos valores do comprimento relativo e índice centromérico apresentados na Tabela 15. A região escura indica a posição do organizador nucleolar.



5 Discussão

A Tabela 16 sumariza o conjunto de dados citogenéticos das espécies da família Nereididae obtidos no presente trabalho e aqueles descritos na literatura.

Tabela 16. Resumo dos dados citogenéticos de espécies da família Nereididae. Pro = procedência (IM = Ilha do Mel, AN = Atlântico Norte, CP = canal Perequê, IT = Itália, CM = canal da Mancha, PN = Pacífico Norte, SC = Escandinávia, RO = Rio Omoi -Japão); 2n = número diplóide; NF = número fundamental; N° NOR = quantidade máxima de marcações NOR; int = localização intersticial; t = localização telomérica. N/d = Não determinado.

Espécie	Pro	2n	NF	Fórmula cariotípica					N° NOR	Cromossomo marcado
				M	sm	st	t	T		
<i>Platynereis dumerilii</i> ⁽⁹⁾	IM	28	56	11	3	-	-	-	4	1 . int. 8 . t
<i>Platynereis dumerilii</i> ⁽¹⁾	AN	28	56	7	7	-	-	-	4	5-6 . t
<i>Perinereis anderssoni</i> ⁽⁹⁾	IM	28	56	10	4	-	-	-	10	7-8-11-12. t 11 . int
<i>Perinereis pontent</i> ⁽⁹⁾	IM	28	“54”	13	-	-	-	1	2	1 . t
<i>Perinereis vancaurica</i> ⁽⁹⁾	CP	28	56	13	1	-	-	-	4	2-9 . t
<i>Perinereis macropus</i> ⁽²⁾	IT	28	56	6	5	3	-	-	2	12-? . t
<i>Perinereis nuntia</i> ⁽³⁾		28	56	10	4				N/d	
<i>Perinereis cultrifera</i> ⁽⁴⁾	CM	34	?						N/d	
<i>Pseudonereis palpata</i> ⁽⁹⁾	IM	28	56	11	3	-	-	-	2	13 . t
<i>Nereis oligohalina</i> ⁽⁹⁾	CP	28	55	7	1	3	2	1	4	1-12. t
<i>Nereis diversicolor</i> ⁽⁴⁾⁽⁸⁾	SC	28								
	CM	32	?							
<i>Nereis acuminata</i> ⁽⁵⁾	AN	22	22	-	-	-	-	11	N/d	
	PN	18	36	4	-	5	-	-		
<i>Nereis arenaceodentata</i> ⁽⁶⁾	AN	24	26	1	-		-	11	N/d	
	PN	18	34	1	-	7		1		
<i>Neanthes japonica</i> ⁽⁷⁾	RO	28	56	-	-		Sis XX-XY		N/d	
<i>Laeonereis culveri</i> ⁽⁹⁾	CP	38	74/75						N/d	

(1) Jha *et al.* (1995).

(2) Lipari e Vitturi (1994).

(3) Zheng *et al.* (1992).

(4) Ometz (1963).

(5) Weinberg (1990).

(6) Pesch (1988).

(7) Sato e Ikeda (1992).

(8) Christensen (1980).

(9) Presente Trabalho.

Os tamanhos cromossômicos e números diplóides em poliquetas tendem a ser menores e menos variáveis se comparados com outros invertebrados marinhos, como por exemplo, os oligoquetas (2n=22-190, moda=36) (GREGORY e HEBERT, 2002). O número diplóide (2n = 28) de seis das sete espécies de nereidídeos analisadas no presente trabalho coincide com o da maioria dos nereidídeos descritos na literatura (JHA *et al.*, 1995; LIPARI e VITTURI, 1994; ZHENG *et al.*, 1992; SATO e IKEDA, 1992). As exceções a este padrão foram registradas em *Nereis arenaceodentata* (2n=18-24) (PESCH, 1988), *Perinereis cultrifera* (2n=34), *Nereis*

diversicolor ($2n=32$) (Ometz, 1963), e *Laeonereis culveri* ($2n=36$) (presente trabalho). Posterior à primeira descrição de *N. diversicolor*, acima mencionada, D. R. DIXON (informação verbal em JHA *et al.*, 1995), analisando material de varias localidades da costa da Inglaterra, mostrou que o $2n$ para esta espécie é igual a 28, contrariando, assim, a determinação original.

Uma particularidade dos poliquetas no tocante à variação no número cromossômico é que esta às vezes está relacionada com o padrão reprodutivo, como é o caso de algumas espécies da família Dorvilleidae (AKESSON, 1975), e do nereidídeo *N. arenaceodentata* ($2n=18-24$) que exibe um modo de reprodução pouco comum entre os nereidídeos, já que os juvenis são criados dentro do tubo com cuidados parentais. Situação similar e peculiar ocorre em *L. culveri* ($2n=38$), uma espécie gonocórica como a maior parte dos nereidídeos, mas sem formação de epítoco. Os indivíduos reprodutores são átocos como muitos nereidídeos de água doce e baixa salinidade (KLESCH, 1970).

O restante dos nereidídeos estudados, com $2n=28$, passam pelo processo de epigamia liberando seus gametas na água. Embora a variação no número diplóide dentro de um grupo taxonômico não esteja, provavelmente, ligada a uma única causa ou efeito (KING, 1993), a natureza conservadora do resto do grupo parece indicar que as variações cromossômicas interespecíficas dentro dos nereidídeos estariam relacionadas de alguma maneira com o padrão reprodutivo, embora os mecanismos ainda não estejam claros.

A análise dos dados das bandas NOR levou em conta o número máximo de marcações observadas em pelo menos uma célula. Em alguns casos foram observadas variações em número de marcações inter e intraindividualmente. A técnica de detecção de NOR, pela impregnação de prata, permite detectar unicamente as que estiveram ativas na última intérfase, isto é, que colaboraram com a produção de ribossomos para a replicação gênica. No contexto desta discussão, interessa saber a quantidade total de regiões de seqüências de rDNA no cariótipo, independente da sua atividade num ou outro ciclo celular.

5.1 *Platynereis dumerilii*.

Platynereis dumerilii é uma espécie presumidamente cosmopolita, embora seja provável que este nome abrigue de fato um complexo de espécies (FAUCHALD, 1977). Os dados citogenéticos de exemplares de *P. dumerilii* da Ilha do Mel (= IM), quando comparados aos dos do Atlântico Norte (= AN)(JHA *et al.*, 1995), mostraram semelhanças e diferenças. Populações de ambas as localidades apresentaram o $2n=28$, $NF=56$, e o comprimento relativo

dos cromossomos praticamente igual. As fórmulas cariotípicas diferem na quantidade de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o que sugere a ação de rearranjos cromossômicos do tipo das inversões pericêntricas envolvidas na modelagem dos respectivos cariótipos.

Esta afirmação está baseada na análise comparativa entre os idiogramas e tamanhos relativos dos cromossomos envolvendo as duas populações: população NA (JHA *et al.*, 1995) e população IM, dados do presente trabalho, o que representa uma comparação mais realista cromossomo a cromossomo. Ao reagrupar os cromossomos por tamanho, independente da morfologia, as bandas NOR de *P. dumerilii* do AN ficam localizadas nos cromossomos 9 e 11, ambos metacêntricos pequenos, enquanto que as NOR de *P. dumerilii* da IM ficam localizadas nos cromossomos 1 (intersticial) e 9.

Nas relações filogenéticas, a presença de um único par portador da NOR tem sido considerada condição ancestral na maioria dos vertebrados (SCHMID 1978; AMEMIYA e GOLD 1990), em alguns invertebrados (VITTURI *et al.*, 1991), inclusive em poliquetas (SELLA, VITTURI e RAMELLA, 1995), todos os demais fenótipos NOR (com dois ou mais pares portadores das NOR) são considerados derivados (HSU *et al.*, 1975). As NOR achadas nos dois citótipos de *P. dumerilii* conduzem à hipótese de um cariótipo ancestral composto de 28 cromossomos bibrâquiados e uma NOR localizada no cromossomo 9. Durante ou após a radiação colonizadora da espécie, as NOR teriam se amplificado para outros cromossomos em forma independente, gerando os dois citótipos NOR divergentes observados, cada um ocupando hoje sua respectiva distribuição geográfica. *P. dumerilii* é a primeira espécie de poliquetas a apresentar uma NOR de posição intersticial.

Apesar da existência destas diferenças elas não são suficientes para a argumentação de que *Platynereis dumerilii* seja de fato um complexo de espécies, tendo em vista que mudanças cromossômicas de adição de seqüências repetitivas, seja heterocromatina ou NOR, são alterações cariotípicas consideradas neutras, não gerando, portanto, heteroses negativa, i.e., diminuição da fertilidade (KING, 1993), embora possam acompanhar a radiação adaptativa de populações ou subpopulações, não têm a capacidade de causar divergência evolutiva nas espécies.

Se existir tal complexo, as diferenciações específicas não estão se refletindo citogeneticamente ou não existem entre as duas localidades analisadas (zonas de entre marés). Neste caso, seriam interessantes estudos comparativos envolvendo populações entre marés com aquelas de locais mais profundos.

5.2 *Perinereis*

O gênero *Perinereis* é considerado polifilético e é também um dos mais politípicos da família. As três espécies analisadas, *P. ponteni*, *P. anderssoni* e *P. vancaurica*, além de *Perinereis macropus* (LIPARI e VITTURI, 1994) e *P. nuntia* (ZHENG *et al.*, 1992) apresentaram um $2n=28$, com diferenças nas fórmulas cariotípicas, isto é, na quantidade de cromossomos em cada uma das categorias morfológicas com respeito à posição do centrômero. Dentre estas, *P. ponteni* é a única espécie com o $NF=54$; ao contrário das outras quatro espécies mencionadas, com todos os cromossomos bibrâquiados ($NF=56$), o seu cariótipo contém um par telocêntrico (Fig 11; Tabela 16). O surgimento de um elemento telocêntrico pode ser produto de uma inversão pericêntrica. Porém, no caso particular de *Perinereis ponteni*, não se descarta a possibilidade de que o par telocêntrico, o menor do complemento cromossômico, seja produto da preparação citológica, já que todas as metáfases analisadas desta espécie apresentaram os cromossomos com um alto grau de contração.

As cinco espécies de *Perinereis* com $2n=28$ e $NF=56$, mostram uma tendência à estabilidade cariotípica. As diferenças nas fórmulas cariotípicas (localização do centrômero) (Tabela 16), considerando a escassez geral de heterocromatina nestes organismos, levam a supor que rearranjos cromossômicos do tipo das inversões pericêntricas foram os responsáveis pela modelação dos diferentes cariótipos. Uma exceção à constância cariotípica foi observada em *P. cultrifera* que mostrou o número diplóide discordante com o grupo ($2n=34$).

Em uma análise morfológica relativamente abrangente de nereidídeos com paragnatas (BAKKEN e WILSON, 2005), foram estabelecidos quatro clados principais separando grupos de espécies. Em dois destes clados localizam-se espécies do gênero *Perinereis* junto com espécies do gênero *Nereis* e *Neanthes*, entre outros. *P. cultrifera* encontra-se num clado distante, e mais derivado, daquele que inclui *P. nuntia*. A separação de *P. cultrifera* com base na morfologia, do grupo de espécies com $2n=28$, permite por enquanto supor que pode ter existido mais de uma tendência cariotípica dentro do gênero *Perinereis*.

O padrão de localização cromossômica das NOR mostrou uma ampla variação dentro do gênero *Perinereis*, exibindo de um a quatro pares cromossômicos portadores. Com base na discussão anterior sobre *Platynereis dumerilii*, observa-se que *P. ponteni* é a espécie que conserva a condição mais primitiva (um único par portador de NOR), enquanto *P. macropus*, *P. vancaurica* e *P. anderssoni* apresentam condições mais derivadas por apresentarem mais de um par cromossômico com NOR, embora não necessariamente formando um agrupamento

de espécies compartilhando algum caráter. De fato, a localização cromossômica das bandas NOR nestas últimas três espécies é bastante diversa.

Com base na posição das NOR nos cariótipos, *P. macropus*, com uma de suas marcações num metacêntrico pequeno, seria ancestral em relação a *P. anderssoni*, que apresenta dois metacêntricos pequenos portadores. Este agrupamento mostra concordância com a proposta de HUTCHINGS *et al.* (1991) (ver Anexo 3), na qual ambas as espécies pertencem ao grupo 1B. Por outro lado, *P. ponteni* (com a NOR no par 1) e *P. vancaurica* (nos pares 2 e 9) indicam origens independentes às duas mencionadas anteriormente e igualmente independentes entre si. Sem dúvida, há a necessidade de se analisar um número maior de espécies para preencher estas lacunas e melhor esclarecer as relações cariotípicas entre as espécies do gênero *Perinereis*, gênero reconhecidamente polifilético.

5.3 *Pseudonereis palpata*

P. palpata apresentou também o número diplóide mais comum dentre os nereidídeos, $2n=28$, e um cariótipo semelhante aos das espécies do gênero *Perinereis*, pela presença dos três primeiros cromossomos de tamanho relativamente maior ao resto do complemento. A presença de um único cromossomo portador da NOR revela a conservação de uma condição ancestral.

5.4 *Nereis* e *Neanthes*

Nereis é o gênero mais diversificado cariotipicamente da família. Duas das espécies listadas na Tabela 18, *Neanthes japonica* (segundo SATO e IKEDA, 1992) e *Nereis diversicolor* (segundo OMETZ, 1963), já foram posteriormente referidas ao gênero *Hediste* (FONG e GARTHWAITE 1994).

Os nomes *Neanthes arenaceodentata*, *Nereis acuminata* e *Neanthes caudata* têm sido aplicados indistintamente a populações de nereidídeos com ampla distribuição no Atlântico norte, tanto na Europa como nas costa pacífica e atlântica dos Estados Unidos. Não é objetivo deste trabalho clarificar a confusa história taxonômica deste táxon, considerado cosmopolita, com base nas semelhanças morfológicas de espécies geograficamente isoladas. Apesar disto, é quase certo que sob este nome se abriga um complexo de espécies morfológicamente muito próximas, como sugerido a seguir. PESCH *et al.* (1988), analisaram duas populações referidas a *Neanthes (Nereis) arenaceodentata*, respectivamente da costa da Califórnia (Pacífico dos

USA) e do Connecticut (costa Atlântica dos EUA). As diferenças cariotípicas: $2n=18$, $NF=34$ (oito pares bibraquiados) e $2n=22$, $NF=24$ (um par bibraquiado), fizeram com que estes autores reconhecessem estas populações como pertencentes a espécies distintas. Posteriormente, WEINBERG *et al* (1990) analisaram também duas populações alopátricas de *Nereis acuminata* da Califórnia (Pacífico) e Connecticut (Atlântico), mas de localidades diferentes às de PESCH *et al.* (1988). Novamente, as diferenças cariotípicas achadas: $2n=18$, $NF=36$ (Pacífico) e $2n=22$, $NF=22$ (Atlântico), somada ao isolamento reprodutivo observado em laboratório, levaram os autores a propor a existência de um complexo de espécies irmãs.

Em resumo, os dados citogenéticos e comportamentais, apresentados por WEINBERG *et al.* (1990) e PESCH *et al.* (1988), sugerem que as populações do Pacífico representam uma nova espécie distinta daquelas populações descritas no Atlântico. Adicionalmente, cada uma das espécies seria politípica devido à existência de populações com diferentes NF. É bastante provável que situações similares ocorram com outros taxa de Nereididae, atualmente reconhecidos como cosmopolitas, mas que se revelarão verdadeiros complexos de espécies, com a intensificação de estudos ecológicos, citogenéticos e moleculares.

A espécie *Nereis oligohalina* compartilha o $2n=28$ com a maioria das espécies de nereidídeos. No entanto, quando comparada com outras espécies do gênero, como *N. acuminata* e *N. arenaceodentata*, mostra-se bem distante do ponto de vista da citogenética. FAUCHALD (1977) afirmou que *Nereis* como gênero constitui um grupo heterogêneo de espécies que pode ser dividido em diferentes grupos menores mais ou menos homogêneos, mas tal revisão ainda necessita ser feita.

5.5 *Laeonereis culveri*

Esta foi a única espécie a apresentar um número diplóide superior ao característico $2n=28$, e também o maior número até agora registrado para a família, $2n=38$. Filogeneticamente encontra-se em uma posição basal e bem distante das outras espécies já apresentadas. Uma outra característica distintiva da espécie foi a presença de uma quantidade extremamente elevada de nucléolos (revelados pela impregnação de prata), na ordem de 20 marcações em média. Nas demais espécies analisadas, o número de nucléolos nas células interfásicas, concordante com o número de cromossomos portadores das NOR, alcançou um máximo de cinco marcações por célula. Embora não tenha sido possível o bandeamento NOR nas metáfases de *L. culveri*, a quantidade de nucléolos observada leva a supor a existência de numerosos cromossomos portadores de NOR, sugerindo uma elevada capacidade de

amplificação e dispersão de seqüências rDNA entre cromossomos não homólogos. Esta marcada diferença no número diplóide sugere que a separação desta espécie, em relação às demais, teria acontecido na origem do grupo taxonômico e seguido um curso independente de evolução cariotípica.

5.6 *Nereididae*

A uniformidade cariotípica já sugerida por JHA *et al.* (1995), foi reafirmada com o incremento de mais seis espécies caracterizadas por um número diplóide de $2n=28$, $NF=56$. Neste sentido, a família Nereididae não é um caso particular de uniformidade cromossômica. As famílias Capitellidae, Nephtyidae, Syllidae e Dorvilleidae têm números diplóides relativamente uniformes (Anexo 2). Ao nível de família ou sub-família, estas estão caracterizadas na sua maior parte por números cromossômicos pouco variáveis, e cada grupo pela sua vez é distinguível dos outros. Em um nível hierárquico inferior de classificação (gênero e espécie), observa-se ainda menos variação, o que indica que as espécies recentes tenham sofrido especiação na ausência de rearranjos cromossômicos. Por outro lado, as diferenças existentes entre as categorias superiores, com $2n=6$ a $2n=64$, indicam que durante a origem e estabelecimento das famílias modernas existiu um período de marcada evolução cromossômica, seguido de diversificação morfológica não acompanhada de mudanças cromossômicas significativas. Um padrão similar foi observado em famílias de tartarugas (BULL, MOON e LEGUER, 1974; BICKHAM, e BAKER, 1976).

Pseudonereis palpata, uma das espécies cariotipicamente uniforme dentro da família, é endêmica das águas do Atlântico Sul, sugerindo que a estabilidade cromossômica do grupo teria sido atingida antes dos membros da família colonizarem a atual costa do Atlântico Sul.

Todas as famílias de poliquetas, incluindo a maioria dos seus gêneros, têm sido reportadas em todos os oceanos e em todas as profundidades (GLASBY e ALVAREZ, 1999). Segundo FAUCHALD (1984), a ampla distribuição das famílias e gêneros é consequência da antiga história evolutiva do grupo. Os escassos registros fósseis mostram que as famílias atuais teriam se diferenciado bem antes da ruptura da Pangea, em contraste com os teleósteos, equinodermos e crustáceos, que experimentaram radiação posterior.

O fator que parece estar correlacionado com o padrão de estabilidade cromossômica é a idade geológica do grupo. Esse tipo de estabilidade dentro de grupos antigos de espécies é explicado pelo “Modelo de Canalização” de BICKHAM e BAKER (1979), ou seja, o nível taxonômico no qual ocorre variação cromossômica está correlacionado com o tempo

evolutivo em que a linhagem tenha ocupado uma zona adaptativa. No gênero *Ctenomys* (Rodentia), por exemplo, surgido há menos de 2 milhões de anos, as variações cromossômicas atingiram o nível específico (BIDAU, GIMENEZ e CONTRERAS, 1996; MASCHERETTI *et al.*, 2000).

O Modelo de Canalização prediz que a evolução cromossômica é mais rápida imediatamente após as colonizações de novas zonas adaptativas e que a estabilidade cromossômica caracteriza linhagens que tenham evoluído para um cariótipo ótimo na sua respectiva zona adaptativa. Neste ponto, então, a progressão do processo evolutivo fica por conta de mudanças gênicas sem perturbação da estrutura cromossômica. No contexto deste modelo, os autores formularam a hipótese de que os diferentes graus de estabilidade cromossômica não estariam relacionados, primariamente, com a estrutura social das populações (baixa fertilidade, alta capacidade de movimentação e delimitação de nichos), como sugerido para explicar a uniformidade cariotípica em Cetacea (ARNASON *et al.*, 1980)), mas com o tempo de permanência destes grupos em suas zonas adaptativas.

O modelo poderia tentativamente explicar o curso evolutivo nos poliquetas, em especial nos Nereididae, mas está ainda longe de ser conclusivo. Varias são as dificuldades impostas pela natureza do modelo, destacando-se a absoluta ausência de evidências a favor do *valor adaptativo* inerente ao cariótipo de um organismo, principal premissa do modelo.

As espécies atuais da família apresentam uma das características mais favoráveis à conservação cariotípica: genomas pequenos com quase ausência de regiões heterocromáticas, ou neutras; característica compartilhada por espécies da Classe Hirudinea (VITTURI *et al.*, 2002).

As características na estrutura dos genomas e o potencial dos elementos transponíveis causando rupturas em sítios particulares, podem levar à formação de certos tipos de rearranjos envolvendo cromossomos específicos ou genomas inteiros. A aparente uniformidade cromossômica encontrada em famílias de plantas e animais (KING, 1993), sugere que genomas particulares têm um alto potencial de mudança, enquanto outros permanecem congelados no tempo. O tipo e a frequência dos rearranjos cromossômicos dependem da estrutura e organização do DNA. Se como observado por (COLLINS e RUBIN, 1984), os sítios de inserção de elementos móveis não são aleatórios, os sítios e as frequências dos rearranjos cromossômicos também não são.

O que levou a estes genomas a interromper a reestruturação de seus cariótipos foram provavelmente fatores adaptativos, de difícil determinação nas condições metodológicas hoje

disponíveis. O atual conhecimento sobre a citogenética dos nereidídeos não deixa dúvidas de que existe uma constância no número diplóide e NF, ao mesmo tempo que a morfologia cromossômica atingiu certo grau de variação. Na medida em que as inversões pericêntricas constituem-se, aparentemente, no único tipo de rearranjo capaz de alterar a posição do centrômero sem modificar o $2n$ e NF, é provável que seja este o principal mecanismo de evolução cromossômica operando nos gêneros e espécies atuais da família.

6 Conclusões

- Para o estabelecimento de rotinas laboratoriais para trabalhos citogenéticos, as espécies dos gêneros *Perinereis*, *Nereis*, *Pseudonereis* e *Platynereis* reagem satisfatoriamente às condições de cultivo, aceitam alimento artificial e são capazes de entrar em fase reprodutiva. *Laeonereis culveri* mostrou-se muito mais sensível em condições de laboratório.
- A taxa de regeneração de tecido é dependente do fotoperíodo e da faixa etária.
- Os cariótipos determinados em *Perinereis ponteni* ($2n=28$; NF=55), *P. anderssoni* ($2n=28$; NF=56), *P. vancaurica* ($2n=28$; NF=56), *Pseudonereis palpata* ($2n=28$; NF=56), *Nereis oligohalina* ($2n=28$; NF=56) e *Platynereis dumerilii* ($2n=28$; NF=56) reafirmam mais uma vez a estabilidade cariotípica das espécies de Nereidídeos. A conservação dos números diplóides, números fundamentais e, por outro lado, as variações nas fórmulas cariotípicas indicam que as inversões pericêntricas representam, aparentemente, o principal mecanismo responsável pela evolução cromossômica na família Nereididae.
- As poucas diferenças encontradas entre *Platynereis dumerilii* do Atlântico Norte ($2n=28$; NF=56), e *P. dumerilii* da Ilha do Mel (Paraná, Brasil) ($2n=28$; NF=56), reveladas nas suas fórmulas cariotípicas e localização cromossômica das NOR, não apoiam a idéia da existência de um complexo de espécies, mas sim de espécie politípica.
- As localizações cromossômicas das regiões organizadoras do nucléolo (NOR) permitiram relacionar *Perinereis anderssoni* a *P. macropus*, sendo esta última ancestral em relação à primeira.
- As bandas NOR presentes em *Perinereis ponteni* e *P. vancaurica* têm origens independentes.

- *Laeonereis culveri* com $2n=38$, mostrou o maior número diplóide encontrado na família Nereididae. Mostrou-se também distinta no que se refere às NOR, devido à presença de numerosas marcações com nitrato de prata.
- A estabilidade cariotípica tem atingido o nível de família no caso dos poliquetas. A diversidade em números diplóides, $2n=6$ até $2n=64$, indica que durante a origem e estabelecimento das famílias modernas (antes da ruptura da Pangea) a evolução cromossômica teve um papel importante, seja causal ou não. Ocorreu em um período restrito (não necessariamente curto) de radiação adaptativa do grupo, deixando de operar durante os processos de dispersão ou vicariância posteriores, o que propiciou um período de conservação cariotípica que se estende até a época atual. Já nos níveis genéricos e específicos, as mudanças cromossômicas operantes são do tipo neutro, envolvendo principalmente inversões pericêntricas em algumas famílias e fusões cêntricas em outras.
- Os achados citogenéticos aqui relatados são inéditos à América do Sul.

GLOSSÁRIO

BIBRAQUIADO: cromossomo de dois braços

CARIOGRAMA: representação gráfica do cariótipo, tomando-se em conta o número e morfologia cromossômica.

CARIOMORFOS: refere-se aos diferentes cariótipos presentes numa espécie polimórfica (dentro de uma mesma população) ou politípica (em subespécies diferentes).

CARIÓTIPO: conjunto de características cromossômicas de uma determinada espécie, entre outros, números diplóide e fundamental, morfologia e padrões de bandas cromossômicas.

EFEITO DE POSIÇÃO: diferença na expressão fenotípica de um ou mais genes causada por uma modificação em sua relação espacial com outros genes no cromossomo.

EPIGAMIA: modificação estrutural no indivíduo adulto em um estágio reprodutivo ou epítoco.

FUSÃO CÊNTRICA: a fusão de dois cromossomos acrocêntricos para formar um cromossomo bibraquiado.

GENOMA: conteúdo genético dos cromossomos.

GONOCÓRICO(A): indivíduo com gônadas funcionais de apenas um sexo; população reprodutora composta de indivíduos machos e fêmeas.

HETEROCROMATINA (CONSTITUTIVA): segmento cromossômico que se apresenta permanentemente condensado; geneticamente inativo; composto por DNA altamente repetitivo e que replica tardiamente na fase S.

HETEROMORFISMO (CROMOSSÔMICO): cromossomos homólogos que diferem em tamanho ou morfologia.

HETEROSES: superioridade do heterozigoto em relação ao homozigoto respeito de um ou mais caracteres; também conhecido como vigor híbrido. É o resultado fenotípico da interação gênica em heterozigotos.

HOMEOLOGIA: refere-se à homologia residual de cromossomos originalmente homólogos.

IDIOGRAMA: representação esquemática do cariótipo, fundamentada em medições do índice centromérico e tamanho relativo dos cromossomos.

INVERSÃO PERICÊNTRICA: rearranjo cromossômico que envolve duas quebras em dois locais distintos do cromossomo, com o centrômero entre as duas quebras, seguido de um giro de 180° do fragmento e posterior fusão deste ao restante do cromossomo. Na maioria dos casos, a posição relativa do centrômero é alterada.

LÍGULA: projeção cônica ou arredondada dos parapódios.

NEUROPÓDIO: ramo ventral do parapódio.

NF (NÚMERO FUNDAMENTAL): o número de braços cromossômicos de um cariótipo.

NOTOPÓDIO: ramo dorsal do parapódio.

PARAGNATA: denticulos esclerotizados presentes na probóscide dos nereidídeos .

POLITÍPICA: uma espécie é dita politípica quando composta de várias subespécies, um gênero quando formado de várias espécies.

PROSTÔMIO: região anterior, região do corpo pré-segmentar e pretrocal com origem na larva episfera; olhos e antenas, quando presentes, localizam-se no prostômio.

SEGREGAÇÃO INDEPENDENTE: quando os membros de um par alélico se transmitem aos gametas de forma independente dos membros de qualquer outro par alélico.

SUPERGENES: conjunto de dois ou mais genes fisicamente ligados no cromossomo e que são herdados como uma unidade.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A.C.Z.; JABLOSKI. Conservação da biodiversidade marinha e costeira do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1. n.1, p. 43-51, 2005.
- AKESSON, B. Reproduction in the genus *Ophryotrocha* (Polychaeta, Dorvillidae). **Pubblicazione della Stazione Zoologica di Napoli** n.39, p.377-398, 1975.
- AMEMIYA, C.T.; GOLD, J.R. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species with comments on cytosystematic relationship among 50 species. **Hereditas**, n. 112, p.231-247, 1990.
- ARNASON, U.; LUTLEY, R.; SANDHOLT, B. Banding studies on six killer whales: an account of C-band polymorphism and G-band patterns. **Cytogenet. Cell. Genet.**, n.28, p.71-78, 1980.
- BAKKEN, T.; WILSON, R.S. Phylogeny of Nereidids (Polychaeta: Nereididae) with paragnaths. **Zoologica Scripta**, n. 34, p.507-547, 2005.
- BICKHAM, J.W.; BAKER, R.J. Chromosome homology and evolution of emydid turtles. **Chromosoma**, n.54, p.201-219, 1976.
- BICKHAM, J. W.; BAKER, R. J. Canalization model of chromosomal evolution. **Bulletin of Carnegie Museum of Natural History**., n.13, p. 70-84, 1979.
- BIDAU, C.J.; GIMENEZ, M.D.; CONTRERAS, J.R. Especiación cromosómica y la conservación de la variabilidad genética: El caso del género *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). **Mendeliana**, v.1, n.12, p.25-37, 1996.
- BULL, J.J.; MOON, R.G.; LEGUER, J.M. Male heterogamety in kinosternid turtles (genus *Staurotypus*). **Cytogenet. Cell. Genet.**, n.13, p.419-425, 1974.
- CHRISTENSEN, B. **Animal Cytogenetics**, 2:Annelida,1-81.- Gebruder Borntraeger, Berlin and Stuttgart. 1980.
- CLARK, M.S.; WALL, W.J. **Chromosomes. The complex code**. Chapman & Hall. London, UK. 1996.
- CLARK, R.B. The origin and formation of the *Heteronereis*. **Biological Reviews**, n.36, p. 199-236, 1961.
- COGNETTI-VARRIALE, A.M.. Citotassonomia di alcune specie di Exogoninae. **Atti Soc. Nat. Mat.** ,n.118, p.3-6,1967
- COLLINS, M.; RUBIN, G.M. Structure of chromosome rearrangements induced by the *FB* transposable element in *Drosophila*. **Nature**, n.308, p.323-327, 1984.
- CURINI-GALLETTI, M.C.; LARDICCI, C.; REGOLI, F. A contribution to the karyology of Syllidae (Polychaeta). **Ophelia**, n.5, p.599-606, 1991

DERJUSHEVA, S.E.; LOGINOVA, J.A.; PARADA, R.; CHIRYAEVA, O.G.; SMIRNOV A.F.; JASZCZAK, K. The comparative analysis of NOR polymorphism detected by FISH and Ag-staining on horse chromosomes. **Caryologia**, n.51, p.1-11, 1998.

DI, S.; KNOWLES, J.F. Chromosomes of the polychaete *Ophryotrocha diadema*. **Ophelia**, v.3, n. 6, p.195-201, 1992.

DIXON, D.R.; PASCOE, P.L.; DIXON, L.R.J. Karyotypic differences between two species of *Pomatoceros*, *P.triqueter* and *P.lamarkii* (Polychaeta: Serpulidae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.4, n.78, p.1113-1126, 1998

FAUCHALD, K. Family revision and cladistic analysis of the Nereididea (Polychaeta: Phyllodocida). **Invertebr.Taxon.** , n.7, p.1551-1573, 1977.

FAUCHALD, K. Polychaete distribution patterns, or: can animals with Palaeozoic cousins show large-scale geographic patterns? **Proceedings of the First International Polychaete Conference** (P.A. Hutchings edds), pp.1-6. The Linnean society of New South Wales, Sydney.

GLASBY, C. Family revision and cladistic analysis of the Nereidoidea (Polychaeta: Phyllodocida). **Invertebr.Taxon.**, n.7, p.1551-1573, 1993.

GLASBY, C. The Namanereidinae (Polychaeta: Nereididae). Part 1. Taxonomy and phylogeny; Part 2. Cladistic biogeography. **Records of Australian Museum**, (suppl. 25), 1-129. 1999.

GLASBY, C.J.; ALVAREZ, B. Distribution patterns and biogeographic analysis of austral polychaeta (Annelida). **Journal of Biogeography**, n.26, p.507-533, 1999.

GRASSLE, J.P.; GELFMAN, C.E.; MILLS, S.W. Karyotypes of *Capitella* sibling species, and of several species in the related genera *Calitellides* and *Capitomastus* (Polychaeta). **Biol.Soc.Wash**, n.7, p.77-88, 1987.

GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N. Genome size estimates for some oligochaete annelids. **Canadian Journal of Zoology** , n.80, p.1485-1489, 2002.

HAGGER, J.A.; FISHER, A.S.; HILL, S.J.; DEPLEDGE, M.H.; JHA, A.N. Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-*n*-butylin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereididae). **Aquatic Toxicology** ,n.57, p.243-255, 2002.

HARTMAN, O. Catalogue of the Polychaetous Annelids of the World. **Occ.Pap.Allan Hancock Fdn** , n.23, p.355-627+197, 1959.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** , n.36, p.1014-1015, 1980.

HSU, T.C.; PATHAK, S.; CHEN, T.R. The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. **Cytogenet Cell Genet.**, n.15, p.41-49, 1975.

HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOT, B.M.; DIXON, D.R. Assessment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilii*) exposed to disinfected municipal sewage effluent. **Mutation Research**, n.399, p.97-108, 1998.

HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; DIXON, D.R. The polychaete *Platynereis dumerilii* (Audouin and Milne-Edwards): A New Species for Assessing the Hazardous Potential of Chemicals in the marine Environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.31, p.271-281, 1995.

HAYASHI, K.I.; MIYATA, T.; HAMANO, T. Chromosome number of eunicid polychaete *Marphysa sanguinea*. **Japan Fish. Sci.** v.2, n.62, p.329-330, 1996.

HOLMQUIST, G.P. Evolution of chromosome bands: Molecular and Ecology of Noncoding DNA. **J. Mol. Evol.**, n.28, p.469-486, 1989.

INSUA, A.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C. The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. **Aquaculture**, n.97, p.317-325, 1991.

JHA, A.N.; HUTCHINSON, T.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M.; DIXON, D.R. Evaluation of the genotoxicity of municipal sewage effluent using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereidae). **Mutation Research**, n.391, p.179-188, 1997.

JHA, A.N.; HUTCHINSON, T.H.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M.; DIXON, D.R. Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereidae). **Mutation Research**, n.359, p.141-150, 1996.

JHA, A.N.; HUTCHINSON, T.H.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M.; PASCOE, P.L.; DIXON, D.R. The chromosomes of *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereidae). **J.Mar.Biol.Ass.**, n.75, p.551-562, 1995.

KING, M. **Species evolution: the mode of chromosome change**. Cambridge University Press. 1993.

KLESCH, W.L. The reproductive biology and larval development of *Laeoneris culveri* Webster (Polychaeta; Nereididae). **Contributions in Marine science**, n.15, p.71-85, 1970.

KORABLEV, V.P.; RADASHEVSKY, V.I.; MANCHENKO, G.P. The XX-XY (male heterogametic) sex chromosome system in *Polydora curiosa* (Polychaeta:Spionidae). **Ophelia**, v.3, n.51, p.193-201, 1999.

LANA, P. C. **Anelídeos Poliquetas Errantes do Litoral do Estado do Paraná**. Tese (Doutorado) – USP, 274 p.1984.

LANA, P.C.; SANTOS, C.S.G. **Anelídeos poliquetas do litoral brasileiro: uma síntese do conhecimento atual e avaliação dos recursos humanos e materiais.** In: **Biodiversidade Marinha Brasileira: o estado da Arte.** Eds. Couto, E.G. & Rocha, G.R.A., EDITUS. 2003.

LAST, K.S.; OLIVE, P.J.W. Photoperiodic control of growth and segment proliferation by *Nereis (Neanthes) virens* in relation to state of maturity and season. **Marine Biology**, n.134, p.191-199, 1999.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, n.52, p.201-220, 1964.

LEWIN, B. **Genes VII.** Oxford University Press, Oxford. 990p. 2000.

LIPARI, R.; VITTURI, R. Cariotipo e organizzatori nucleolari (NORs) in *Perinereis macropus* (Claparede, 1870) (Annelida: Polychaeta). **Biol. Mar. Medit.**, v.1, n.1, p.361-362, 1994.

MARTIN, F.; TRAUT, W. The mode of sex determination in *Dinophilus gyrocilatus* (Archannelida). **Int.J.Invert.Reprod.Dev.,(Amsterdam)**, n.11, p.159-172, 1987.

MASCHERETTI, S.; MIROL, P.M.; GIMÉNEZ, M.D.; BIDAÚ, C.J.; CONTRERAS, J.R.; SEARLE, J.B. Phylogenetics of the speciose and chromosomally variable rodent genus *Ctenomys* (tenomyidae, Octodontoidea), based on mitochondrial cytochrome *b* sequence. **Biological Journal of Linnean Society** n.70, p.361-376, 2000.

MAZURKIEWICZ, M. Larval development and habits of *Laeonereis culveri* (Webster) (Polychaeta: Nereididae). **Biological Bulletin**, n.149, p.186-204, 1975.

McCLINTOCK, B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zellforsch. Mik.Anat.** n.21, p.294-328, 1934.

MILLER, O.J. Nucleolar organizers in mammalian cells. **Chromosomes Today** Volume 7. Columbia University Press, New York, NY. 1981.

OMETZ, S. Données cariologiques sur deux espèces de Néréidiens: *Perineris cultrifera* Grube et *Nereis diversicolor* O.F.Müller (Annélides : Polychètes). **Comptes rendus des séances de la Société de Biologie**, n.4, p.813, 1963.

ORENSANZ, J. M.; GIANUCA, N. M. Contribuição ao conhecimento dos anelídeos poliquetas do Rio Grande do sul, Brasil. I. lista sistematica preliminar e descricao de tres novas especies. **Comunicações do Museu de Ciências da.PUCRGS**, v. 4, p. 01-34, 1974.

PARDUE, M.L.; HENNIG, W. Heterochromatin: Junk or collector item?. **Chromosoma**, n.100, p.3-7, 1990.

PESCH, G.G.; PESCH, C.E.; MULLER, C.. Chromosome complements from two populations of the marine worm *Neanthes arenaceodentata* (Annelida: Polychaeta). **Ophelia**, v.2, n.28, p.163-167, 1988a.

PESCH, G.G.; MULLER, C.; PESCH, C.E. Chromosomes of the marine worm *Nephtys incisa* (Annelide:Polychaeta). **Ophelia**, v.2, n.28, p.157-161, 1988b.

PETTIBONE, M. H.. Revision of some species referred to *Leptonereis*, *Nicon*, and *Laeonereis* (Polychaeta: Nereididae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v.104, p. 01-53, 1971.

REN, X.; XIANJUE, Y.U. Characterization of nucleolar organizer regions of twelve species of Chinese cyprinid fishes. **Caryologia** , n.46, p.201-207, 1993.

ROBOTTI, C.; RAMELLA, L.; CERVELLA, P.; SELLA, G. Chromosome analysis of nine species of *Ophryotrocha* (Polychaeta: Dorvilleidae). **Ophelia Suppl**, n.5, p.625-632, 1991.

ROUSE, G. W.; FAUCHALD, K. Cladistics and polychaetes. **Zoologica Scripta**. n.26, p.139-204, 1997.

ROUSE, G.W.; PLEIJEL, F. **Polychaetes**. Oxford University Press, London. 2001

SANTOS, C.S.G. **Nereididae (Annelida: Polychaeta) da costa nordeste do Brasil (2°S-18°S)**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, 170 p.1996.

SATO, M.; IKEDA, M. Chromosomal complements of two forms of *Neanthes japonica* (Polychaeta, Nereididae) with evidence of male-heterogametic sex chromosomes. **Marine Biology**, n.112, p.299-307, 1992.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Racophoridae. **Chromosoma** n.68, p.131-148, 1978

SCHROEDER, P.C.E.; HERMANS, C.O. Annelida: Polychaeta. **In:Reproduction of marine invertebrates.** pp. 1-213. New York. 1975.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli: cytological findings. **Chromosomes today**. Volume 9. Proceedings of the Ninth International Chromosome Conference, Marseille, France. Edmondsbury Press, Suffolk, Great Britain. 317pp. 1986.

SELLA, G.; VITTURI, R.; RAMELLA, L.; COLOMBA, M.S. Chromosomal nucleolar organizer region (NOR) phenotypes in nine species of the genus *Ophryotrocha* (Polychaeta:Dorvilleidae). **Marine Biology**, n.124, p.425-433, 1995.

SEUÁNEZ, H.N. The chromosomes of man: evolutionary considerations. *In:* G. Obe and A. Basler (ed.) **Cytogenetics**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp:65-88. 1987.

STEINER, T. M. **Eunicida e Phyllodocida (Polychaeta, Aciculata) de praias do litoral norte do Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 180 p. 2000.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.** n.75, p.304-306, 1972.

VITTURI, R.; COLOMBRERA, D.; CATALANO, E.; AMICO, F.P. Karyotype analysis, nucleolus organizer regions and C-banding patterns of *Eistenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Genetica** , n.83, p.159-165, 1991.

VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; ARMETTA, F.; SPARACINO, L.; COLOMBA, M.S. "Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA) telomeric (TTAGGG)_n and (GATA)_n repeats in the leech *Haemopsis sanguisuga* (L.) (Annelida:Hirudinea)." **Genetica**, n.115, p.189-194, 2002.

VITTURI, R.; RAMELLA, L.; COLOMBA, M.S.; CAPUTO, V.; SELLA, G. NOR regions of polychaete worms of the genus *Ophryotrocha* studied by chromosome banding techniques and FISH. **The American Genetic Association**, n.91, p.18-23, 2000.

VOLLETH, M. Differences in the location of nucleolus organizer regions in European vesper lionid bats. **Cytogenet. Cell Genet.** n.44, p.186-197, 1987.

WEINBERG, J.R.; STARCZAK, V.R.; MULLER, C.; PESCH, G.C.; LINDSAY, S.M. Divergence between populations of monogamous polychaete with male parental care: premating isolation and chromosome variation. **Marine Biology**, n.107, p.205-213, 1990.

WILSON, R. S. **Family Nereididae**. Pp. 138-141 in Beesley, P.L., Ross, G.J.B. & Glasby, C.J. (eds) *Polychaetes & Allies: the Southern Synthesis. Fauna of Australia. Vol. 4a, Polychaeta, Myzostomida, Pogonophora, Echiura, Sipuncula*. (CSIRO) Melbourne xii 465 p.p.2000.

ZHENG, J.; WANG, M.; SUN, X.; ZHOU, Z. Karyotype studies on *Perinereis nuntia* (Savigny, 1818). **J.Ocean.Univ.Qingdao-Qingdao-Haiyang.Daxue.Xuebao**, v.2, n.22, p.102-106, 1992.

ANEXO 1

Fórmulas utilizadas nos cálculos do Índice Centromérico e comprimento relativo. IC=Índice centromérico; bc=braço curto; lt=comprimento total

$$\text{IC (x)} = \frac{\sum (bc \div lt) \times 100}{N} \quad \text{Variança. } s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \text{Desvio. } S = \sqrt{s^2}$$

$$\text{Error padrão. ES} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Morfologia} = \text{IC} \pm \text{ES}$$

$$\text{Comprimento relativo} = \frac{\sum \chi_T}{\chi_{\text{Compl}}} \times 100$$

onde X_T =média do comprimento de um par cromossômico dado,e

X_{Compl} =média do comprimento dos complementos cromossômicos.

Na prática, os dados das medições cromossômicas e as fórmulas foram inseridos numa planilha do Excel.

Classificação cromossômica segundo Levan (1972)

IC	Cromossomo	Nomenclatura
50	metacêntrico	M (isocromossomo)
50-37,5	metacêntrico	M
37,5-25	submetacêntrico	Sm
25-12,5	subtelocêntrico	St
12,5-0	Telocêntrico	T
0	Telocêntrico	T

ANEXO 2

Tabela 17. Números cromossômicos de espécies pertencentes a outras famílias de poliquetas.

Família	Espécie	2n-NF	Ref.
Capitellidae	<i>Capitella</i> TXFF	18	1
	<i>Capitella</i> MB/sl	20	1
	<i>Capitella</i> ORL	20	1
	<i>Capitella</i> sp. Ia	20	1
	<i>Capitella</i> sp. I	20	1
	<i>Capitella</i> OSLO/11	26	1
	<i>Capitella</i> sp. II	26	1
	<i>Capitella</i> sp. IIIa	26	1
	<i>Capitella</i> NYB	26	1
	<i>Capitomastus</i> sp	18	1
	<i>Capitomastus</i> YAK	26	1
	<i>Capitomastus</i> LINK	26	1
Nephtyidae	<i>Nephtys incisa</i>	38-76	2
	<i>Nephtys hombergi</i>	36	3
Syllidae	Sub-F: Exogoninae		
	<i>Parapionasyllis labronica</i>	12-24	4
	<i>Parapionasyllis elegans</i>	12-24	4
	<i>Pseudobrania clavata</i>	12-24	4
	<i>Exogone naidina</i>	8-16	4
	<i>Exogone brevipes</i>	16	5
	<i>Sphaerosyllis austriaca</i>	14-28	4
	<i>Sphaerosyllis pirifera</i>	14-28	4
	<i>Sphaerosyllis bulbosa</i>	18	5
	Sub-F: Eusyllinae		
	<i>Syllides fulva</i>	18	4
	Sub-F: Syllinae		
	<i>Syllidea armillaris</i>	26-52	4
	Sub-F: Autolytinae		
	<i>Autolytus edwardsi</i>	12	3
	<i>Autolytus prolifer</i>	12	3
	<i>Proceraea picta</i>	8	4
	<i>Proceraea macrophthalma</i>	10	4
Dorvilleidae	<i>Ophryotrocha costlowi</i>	6-12	6
	<i>O</i> sp. <i>macrovifera</i>	6-12	6
	<i>O. notoglandulata</i>	6-12	6
	<i>O. sp.l.pacifica</i>	6-12	6
	<i>O. l. labronica</i>	6-12	6
	<i>O. p. puerilis</i>	8-16	6
	<i>O. p. siberti</i>	8-16	7
	<i>O. diadema</i>	8-16	6
	<i>O. hartmanni</i>	10-20	6
	<i>O. gracilis</i>	10-20	6
	<i>O. robusta</i>	10-18	6
Spionidae	<i>Polidora curiosa</i>	34	8
Serpulidae	<i>Pomatoceros lamarkii</i>	24	9
	<i>Pomatoceros triqueter</i>	24	9

Archiannelida	<i>Dinophilus gyrocilatus</i>	32	10
----------------------	-------------------------------	----	----

-
1. Grassle JP (1987)
 2. Pesch *et al* (1988b)
 3. Christensen (1980)
 4. Curini-Galletti *et al* (1991)
 5. Congetti-Varriale (1967)
 6. Vitturi *et al* (2000)
 7. Robotti *et al* (1991)
 8. Korablev *et al* (1999)
 9. Dixon *et al* (1998)
 10. Martin e Traut (1987)
-

ANEXO 3

HUTCHINGS, REID e WILSON (1991) organizaram as espécies do gênero *Perinereis* em um agrupamento informal de acordo com o número de paragnatas em forma de barra presentes na região VI da faringe: grupo 1 - espécies com uma paragnata em barra; grupo 2, espécies com duas paragnatas em barra; grupo 3, com três ou mais paragnatas em barra. Cada um destes grupos foi, por sua vez, subdividido em A e B, sendo que as espécies incluídas no subgrupo A são aquelas que apresentam lígula notopodial dorsal não expandida, enquanto que as que pertencem ao subgrupo B, lígula notopodial dorsal expandida. (Fig. 18)

Figura 18: A, lígula notopodial de parapódios posteriores expandida (lino); B, paragnatas em forma de barra (pg).

